

FR 2696189

1/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009848430

WPI Acc No: 1994-128286/199416 XRAM Acc No: C94-059038

**DNA involved in streptogramin antibiotic biosynthesis - for prodn. or
bio-conversion of streptogramin(s) or prodn. of streptogramin
intermediates, derivs. or hybrid antibiotics**

Patent Assignee: RHONE-POULENC RORER SA (RHON); RHONE POULENC RORER SA
(RHON); AVENTIS PHARMA SA (AVET); BLANC V (BLAN-I); BLANCHE F
(BLAN-I); CROUZET J (CROU-I); DE CRECY-LAGARD V (DCRE-I); DEBUSSCHE L
(DEBU-I); JACQUES N (JACQ-I); LACROIX P (LACR-I); THIBAUT D (THIB-I);
ZAGOREC M (ZAGO-I)

Inventor: BLANC V; BLANCHE F; CROUZET J; JACQUES N; LACROIX P; THIBAUT D;
ZAGOREC M; THIBEAULT D; DE CRECY-LAGARD V; DEBUSSCHE L; DE CRECY-LAGARDE
V; LA-CROIX P; COUZET J

Number of Countries: 025 Number of Patents: 016

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
FR 2696189	A1	19940401	FR 9211441	A	19920925	199416	B
WO 9408014	A1	19940414	WO 93FR923	A	19930925	199416	
ZA 9307102	A	19940629	ZA 937102	A	19930924	199428	
AU 9348239	A	19940426	AU 9348239	A	19930925	199432	
FI 9501403	A	19950324	WO 93FR923	A	19930925	199525	
			FI 951403	A	19950324		
EP 662134	A1	19950712	EP 93920919	A	19930925	199532	
			WO 93FR923	A	19930925		
JP 8501696	W	19960227	WO 93FR923	A	19930925	199643	
			JP 94508766	A	19930925		
NZ 256053	A	19970324	NZ 256053	A	19930925	199719	
			WO 93FR923	A	19930925		
AU 9861891	A	19980611	AU 9348239	A	19930925	199834	
			AU 9861891	A	19980414		
AU 692138	B	19980604	AU 9348239	A	19930925	199839	
US 5891695	A	19990406	WO 93FR923	A	19930925	199921	
			US 95403852	A	19950510		
US 6077699	A	20000620	WO 93FR923	A	19930925	200035	
			US 95403852	A	19950510		
			US 95510646	A	19950803		
US 6171846	B1	20010109	WO 93FR923	A	19930925	200104	
			US 95403852	A	19950510		
			US 99231818	A	19990115		
CA 2145523	C	20030603	CA 2145523	A	19930925	200344	
			WO 93FR923	A	19930925		
KR 359226	B	20030418	WO 93FR923	A	19930925	200359	
			KR 95701157	A	19950324		
US 6670157	B1	20031230	WO 93FR923	A	19930925	200402	N
			US 95403852	A	19950510		
			US 99231818	A	19990115		
			US 2000635359	A	20000809		

Priority Applications (No Type Date): FR 9211441 A 19920925; US 2000635359
A 20000809

Cited Patents: 9.Jnl.Ref; JP 59059198

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
FR 2696189	A1	83		C12N-015/31	
WO 9408014	A1			C12N-015/52	

Designated States (National): AU CA FI JP KR NZ US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL
PT SE

ZA 9307102	A	230	C12N-000/00	
AU 9348239	A		C12N-015/52	Based on patent WO 9408014
FI 9501403	A		C07K-000/00	
EP 662134	A1 F		C12N-015/52	Based on patent WO 9408014
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE				
JP 8501696	W	194	C12N-015/09	Based on patent WO 9408014
NZ 256053	A		C07H-021/00	Based on patent WO 9408014
AU 9861891	A		C07C-211/46	Div ex application AU 9348239
AU 692138	B		C12N-015/31	Previous Publ. patent AU 9348239 Based on patent WO 9408014
US 5891695	A		C12N-009/00	Based on patent WO 9408014
US 6077699	A		C12N-009/00	CIP of application WO 93FR923 CIP of application US 95403852
US 6171846	B1		C12N-001/20	Div ex application WO 93FR923 Div ex application US 95403852 Div ex patent US 5891695
CA 2145523	C F		C12N-015/52	Based on patent WO 9408014
KR 359226	B		C12N-015/52	Previous Publ. patent KR 95703646 Based on patent WO 9408014
US 6670157	B1		C12P-017/14	Div ex application WO 93FR923 Div ex application US 95403852 Div ex application US 99231818 Div ex patent US 5891695 Div ex patent US 6171846

Abstract (Basic): FR 2696189 A

Nucleotide sequences (I) coding for a polypeptide involved in the biosynthesis of streptogramins are new.

Also claimed are: (1) recombinant DNA (II) comprising a gene for streptogramin biosynthesis; (2) expression vectors (III) capable of autonomic and/or integrative replication, comprising (I) or (II); (3) recombinant cells contg. (I), (II) and/or (III); (4) mutants of streptogramin-producing microorganisms, with a genetic modification in a gene involved in streptogramin biosynthesis; (5) polypeptides resulting from the expression of (I) or (II); and (6) polypeptides comprising all or part of polypeptides SnaA, SnaB, SnaC, SnbA and SnbR or their derivs.

USE - The recombinant cells can be cultured to produce streptogramins esp. pristinamycins, mikamycins or virginiamycins, which are antibiotics, esp. active against Gram-positive bacteria (see Microbiol. Rev., 43, 145, 1979). Mutant microorganisms in which a step in the streptogramin biosynthetic pathway is blocked can be cultured to produce streptogramin intermediates, which may be converted to streptogramin derivs. The recombinant cells may also be used for bioconversion of streptogramin (from one form to another) or for prodn. of hybrid antibiotics.

Dwg.4/11

Title Terms: DNA; ANTIBIOTIC; BIOSYNTHESIS; PRODUCE; BIO; CONVERT; PRODUCE;
INTERMEDIATE; DERIVATIVE; HYBRID; ANTIBIOTIC

Derwent Class: B04; D16

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication : **2 696 189**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②⑪ N° d'enregistrement national : **92 11441**

⑤① Int Cl⁵ : C 12 N 15/31, 15/81, 15/01, C 12 P 21/02

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 25.09.92.

③⑦ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 01.04.94 Bulletin 94/13.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : RHONE-POULENC RORER (S.A.) —
FR.

⑦② Inventeur(s) : Blanc Véronique, Blanche Francis,
Crouzet Joël, Jacques Nathalie, Lacroix Patricia,
Thibaut Denis et Zagorec Monique.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire :

⑤④ Polypeptides impliqués dans la biosynthèse des streptogramines, séquences nucléotidiques codant pour ces polypeptides et leur utilisation.

⑤⑦ La présente invention concerne les séquences nucléotidiques codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, les cellules recombinantes contenant de telles séquences, et leurs utilisations.

FR 2 696 189 - A1



POLYPEPTIDES IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES STREPTOGRAMINES. SEQUENCES
NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR CES POLYPEPTIDES ET LEUR UTILISATION.

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines et comprend également l'isolement et l'identification
5 de gènes de biosynthèse des composants A et B des Streptogramines, l'expression de ces gènes dans le but d'augmenter les taux de production et leur utilisation pour la construction de mutants bloqués pouvant conduire à la synthèse de nouveaux antibiotiques ou à des formes dérivées de Streptogramines

Les Streptogramines forment un groupe homogène d'antibiotiques constitués
10 d'une association de deux types de molécules chimiquement différentes; d'une part des macrolactones polyinsaturées (composants du groupe A, dont deux exemples de structures sont présentées figure 1) et d'autre part, des depsipeptides (composants du groupe B, dont trois exemples de structure sont présentés sur la figure 2). Ce groupe comprend de nombreux antibiotiques (cf. tableau 1) connus sous différents noms en
15 fonction de leur origine dont les Pristinamycines, les Mikamycines, les Virginiamycines (pour une revue, voir Cocito 1979, 1983).

Les composants A et B ont une activité antibactérienne synergique qui peut atteindre 100 fois celle des composants séparés et qui, contrairement à celle de chaque composant, est bactéricide (Cocito 1979). Cette activité est plus particulièrement
20 efficace contre les bactéries Gram-positives, comme les Staphylocoques et Streptocoques (Cocito 1979, Videau 1982). Les composants A et B inhibent la synthèse protéique en se fixant à la sous-unité 50S du ribosome (Cocito 1979 ; pour une revue, voir Di Giambattista et al. 1989).

Les Streptogramines sont essentiellement produites par des Actinomycètes dont
25 de nombreux Streptomycètes, présentés dans le tableau 1. En outre, les Streptogramines sont aussi synthétisées par des eucaryotes tel que Micromonospora qui synthétise les Vernamycines. Les Actinomycètes constituent un groupe de microorganismes très intéressant du fait de la quantité importante de métabolites secondaires qu'ils produisent, parmi lesquels de nombreux antibiotiques (Beta-lactames, Tétracyclines, Macrolides, Aminoglycosides, Polyacétates, etc), des
30 herbicides, des anti-cancéreux, des antifongiques, des immunomodulateurs, des inhibiteurs d'enzymes. De nombreuses voies de biosynthèse, concernant des antibiotiques appartenant à des classes variées ainsi que d'autres métabolites secondaires tels que des pigments (pour une revue, Chater 1990), ont à ce jour déjà

été étudiées chez les Actinomycètes. Un aspect important de ce groupe de bactéries, est que les gènes impliqués dans une même voie de biosynthèse, gènes de structure, mais également, gène(s) de résistance et gène(s) de régulation, sont groupés physiquement sur le chromosome, constituant des clusters, pouvant atteindre plus de 100 Kb (Hopwood *et al.* 1986a, Hopwood *et al.* 1986b, Hallam *et al.* 1988, Anzai *et al.* 1987, Onuki *et al.* 1985b). A ce jour aucun exemple n'est venu contredire cette constatation. Une telle organisation structurale présente un intérêt important dans le développement des stratégies de clonage des gènes de biosynthèse. En effet, il est possible, à partir d'un seul gène préalablement cloné par des techniques diverses, gène de biosynthèse, de résistance ou de régulation, de marcher le long du chromosome et d'isoler ainsi l'ensemble des gènes du cluster de biosynthèse.

La connaissance des voies de biosynthèse de chacun des composants des Streptogramines n'est que très partielle à ce jour, mais l'origine des différentes parties de chaque molécule a été identifiée par marquage radioactif (Kingston *et al.* 1983). Ainsi, les composants de type A sont formés de deux régions provenant de la condensation d'acétates et de plusieurs acides aminés tels que la sérine, la glycine, par exemple. En ce qui concerne les composants de type B, des études ont montré que tous les acides aminés présents dans la chaîne peptidique dérivent des acides aminés naturels (Hook et Vining 1973). Toutefois, aucun polypeptide impliqué dans ces voies n'a été purifié en quantité suffisante à ce jour pour permettre sa caractérisation moléculaire, et aucun gène de biosynthèse n'a été décrit.

La présente invention résulte de la purification de polypeptides intervenant dans la biosynthèse des Streptogramines ainsi que du clonage de gènes dont le produit intervient dans la biosynthèse des Streptogramines. La présente invention permet ainsi d'augmenter les taux de production de ces métabolites grâce aux techniques d'ADN recombinant. Un autre intérêt de la présente invention réside dans la possibilité, par construction de mutants bloqués dans les différentes étapes de cette biosynthèse, de produire des intermédiaires de synthèse de chacun des deux composants. Ces intermédiaires peuvent servir de substrats à de nouvelles modifications, par voie chimique, biochimique, enzymatique ou microbiologique. De même l'isolement des gènes de biosynthèse permet, par transfert des gènes entre souches productrices, de fabriquer des antibiotiques hybrides ayant des propriétés pharmacologiquement intéressantes (Hopwood *et al.* 1985a, Hopwood *et al.* 1985b, Hutchinson *et al.* 1989). Un autre intérêt de la présente invention réside dans le fait qu'elle apporte une meilleure connaissance des voies de biosynthèse des métabolites

classés comme des Streptogramines. En effet, l'invention permet de construire des souches bactériennes ou fongiques dans lesquelles on exprime, sous le contrôle de signaux d'expression appropriés, une ou plusieurs protéines intervenant dans la biosynthèse des Streptogramines. De telles souches peuvent alors être utilisées pour
5 réaliser des bioconversions. Ces bioconversions peuvent se faire soit à l'aide de cellules entières, soit à l'aide d'extraits acellulaires des dites cellules. Ces bioconversions peuvent permettre de transformer une Streptogramine en une forme dérivée, avec une enzyme d'une voie de biosynthèse. Par exemple, la Pristinamycine IIB peut être, de cette manière, transformée en Pristinamycine IIA. Le même
10 raisonnement peut être appliqué à tout intermédiaire de biosynthèse.

Un premier objet de l'invention concerne donc une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines.

Plus particulièrement, plusieurs gènes dont le produit intervient dans la biosynthèse des Streptogramines ont été isolés à partir de Streptomyces
15 pristinaespiralis. Les Streptogramines produites par cette souche étant plus communément désignées par le terme Pristinamycines (Cf tableau 1), dans ce qui suit, référence sera faite dans certains cas aux gènes de biosynthèse des Pristinamycines. Mais il est clair que les résultats obtenus s'appliquent à l'ensemble des Streptogramines. Les Pristinamycines I et II correspondent respectivement aux
20 composants B et A des Streptogramines. Les molécules de la famille des Pristinamycines II et de la famille des Pristinamycines I, désignent donc dans ce qui suit les composants A et B des Streptogramines respectivement.

La présente invention décrit en particulier l'isolement et la caractérisation des gènes snaA, snaB, snaC, snbA et snbR. Ces gènes ont été isolés à partir d'une banque
25 d'ADN génomique de S. pristinaespiralis. Cette banque a été obtenue par digestion partielle de l'ADN génomique de S. pristinaespiralis, par l'enzyme de restriction Sau3A. De larges fragments d'ADN, de 40 à 50 Kb en moyenne, ont été clonés dans le cosmide pHC79 (Hohn, B., and Collins, J. F., 1980). Après encapsidation in vitro, les souches d'E.coli HB101 (Boyer et Roulland-Dussoix, 1969) et DH1 (Low, 1968)
30 ont été transfectées. La banque d'ADN de S. pristinaespiralis se trouve ainsi dans deux souches différentes d'E.coli.

Les gènes snaA, snaB et snaC sont présents sur le cosmide pIBV1 (figure 4). Le produit des gènes snaA et snaB, correspondant aux polypeptides SnaA et SnaB, intervient dans la dernière étape de biosynthèse du composant II des Pristinamycines
35 (conversion de la Pristinamycine IIB en Pristinamycine IIA) correspondant à

l'oxydation de la liaison 2,3 de la D-proline. Ces deux polypeptides constituent les deux sous-unités de Pristinamycine IIA synthase dont la purification est décrite dans la présente invention. Le produit du gène snaC interviendrait dans la synthèse de la SAM (donneur de groupements méthyls) à partir d'ATP et de méthionine. Le composant A de la plupart des Streptogramines est en effet méthylé en C-4 (figure 1), et il a été décrit (Kingston *et al.*, 1983) que ce méthyl dérive du méthyl de la méthionine, très probablement via une réaction de méthylation avec la SAM. Le gène snaC coderait donc pour une SAM synthase (EC. 2.5.1.6) spécifique de la voie de biosynthèse des Pristinamycines.

Les gènes snbA et snbR sont présents sur le cosmide pIBV2 (figure 5). Le gène snbA correspond, d'après les études biochimiques présentées dans l'exemple 5, à la première étape de la synthèse des Pristinamycines I. Il s'agit de l'activation du premier acide de la chaîne, l'acide 3-hydroxypicolinique, par adénylation. Le gène snbR pourrait intervenir dans le transport des molécules de la famille des Pristinamycines I (voire des Pristinamycines II) hors de la cellule, après synthèse, conférant ainsi, à la souche productrice une résistance à ce composant.

Ces différents gènes ont été sous-clonés à partir de leur cosmide d'origine et leurs séquences nucléiques ont été déterminées. Les gènes snaA, snaB et snaC, ont été sous-clonés sur un fragment BamHI-BamHI de 6 kb, dont une partie a été séquencée (SEQ ID n° 1). Le gène snbA a été sous cloné sur un fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb, dont une partie a été séquencée (SEQ ID n° 8). Le gène snbR a été sous cloné sur un fragment BglII-BglII de 4.6 kb, dont une partie a été séquencée (SEQ ID n° 10).

La proximité des gènes snaA, snaB et snaC ainsi que des gènes snbA et snbR, confirme la localisation en clusters des gènes de biosynthèse des composants A et B des Streptogramines. Il est donc évident que les régions qui entourent les gènes identifiés dans la présente invention (snaA, snaB et snaC, snbA et snbR), contiennent les autres gènes du cluster de biosynthèse des Pristinamycines, et que ces gènes peuvent être utilisés pour localiser les autres gènes de biosynthèse des Streptogramines.

Préférentiellement, l'invention a pour objet une séquence nucléotidique choisie parmi :

(a) les gènes snaA (SEQ ID n° 2), snaB (SEQ ID n° 4), snaC (SEQ ID n° 6), snbA (SEQ ID n° 8) et snbR (SEQ ID n° 10),

(b) les séquences adjacentes aux gènes (a) constituant les clusters de biosynthèse et codant pour les polypeptides impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines,

(c) les séquences hybridant avec tout ou partie des gènes (a) ou (b) et codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, et,

(d) les séquences dérivées des séquences (a), (b) et (c) en raison de la dégénérescence du code génétique.

Encore plus préférentiellement, l'invention a pour objet les séquences nucléotidiques représentées par les gènes snaA (SEQ ID n° 2), snaB (SEQ ID n° 4), snaC (SEQ ID n° 6), snbA (SEQ ID n° 8) et snbR (SEQ ID n° 10).

Un autre objet de l'invention concerne tout ADN recombinant comprenant un gène de biosynthèse des Streptogramines. Plus préférentiellement, il s'agit d'un ADN recombinant comprenant tout ou partie des cosmides pIBV1 ou pIBV2 tels que représentés sur les figures 4 et 5 ou tout ou partie de séquences hybridant avec les cosmides pIBV1 ou pIBV2 ou avec des fragments de ceux-ci.

Dans un mode préféré de l'invention, les séquences nucléotidiques définies ci-dessus font partie d'un vecteur d'expression, qui peut être à répllication autonome ou intégratif.

Comme indiqué plus haut, bien que l'invention soit plus particulièrement illustrée avec les gènes de biosynthèse de la Pristinamycine, il est clair que les résultats obtenus s'appliquent à l'ensemble des Streptogramines.

Plus particulièrement, les techniques développées dans la présente invention pour purifier des protéines ou cloner des gènes de biosynthèse des Streptogramines à partir de S.pristinaespiralis peuvent être appliquées aux autres microorganismes producteurs de Streptogramines (Cf tableau 1).

Ainsi, la purification d'une activité enzymatique à partir de S. pristinaespiralis rend possible la purification de la même activité à partir d'une autre souche productrice de Streptogramine. La présente invention peut donc être appliquée au clonage de gènes de biosynthèse de Streptogramine à partir de tout microorganisme producteur par purification d'une protéine intervenant dans la biosynthèse puis, à l'aide de la séquence NH₂-terminale de celle-ci, synthèse d'une sonde oligonucléotique qui permet de cloner le gène correspondant. Ensuite une marche sur le chromosome permet d'identifier le cluster de biosynthèse en entier.

De plus, à partir des gènes identifiés dans la présente demande, il est possible, par hybridation, de cloner directement les gènes de biosynthèse des Streptogramines à partir de l'ADN d'un autre microorganisme producteur. En effet, les gènes de biosynthèse des Pristinamycines hybrident fortement à ceux des autres Streptogramines. Il est ainsi possible de cloner par hybridation les gènes de biosynthèse des Streptogramines en utilisant comme sonde les gènes sna ou snb, ou des fragments de ceux-ci, ou les fragments adjacents à ceux-ci contenant, comme il est montré dans la présente invention, d'autres gènes sna et snb. Ceci résulte du fait que (1) les Streptogramines produites par les différents microorganismes ont des structures identiques ou similaires (voir figure 3), (2) les gènes de biosynthèse des Streptogramines sont organisés en clusters, et (3) les systèmes enzymatiques responsables de cette biosynthèse n'ont pas une spécificité absolue pour leurs substrats.

Par ailleurs, le clonage de gènes impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines peut aussi se faire en utilisant des oligonucléotides dégénérés, préparés à partir des séquences des gènes sna ou snb cités plus haut, ou des fragments de ces gènes, ou des fragments contigus à ces gènes. Il est ainsi possible d'aller piocher les gènes de biosynthèse des composants A et B des différentes souches productrices de Streptogramines. Ces souches peuvent faire partie du genre Streptomyces, mais aussi d'autres genres (Cf tableau 1). En outre, si l'ADN génomique des souches de départ utilisées a une composition en G+C différente de celle observée chez les Streptomyces les sondes utilisées peuvent être synthétisées avec un biais de codon spécifique du genre ou de l'espèce à partir duquel on veut isoler l'ADN.

Un autre objet de la présente invention concerne les polypeptides résultant de l'expression des séquences nucléotidiques définies ci-dessus. Plus particulièrement, la présente invention concerne les polypeptides comprenant tout ou partie des polypeptides SnaA (SEQ ID n° 3), SnaB (SEQ ID n° 5), SnaC (SEQ ID n° 7), SnbA (SEQ ID n° 9) et SnbR (SEQ ID n° 11) ou de dérivés de ceux-ci. Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute molécule obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence peptidique. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité du peptide pour son(ses) substrat(s), celui d'améliorer ses niveaux de

production, celui d'augmenter sa résistance à des protéases, celui d'augmenter et/ou de modifier son activité, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés biologiques. Parmi les dérivés résultant d'une addition, on peut citer par exemple les polypeptides chimères comportant une partie hétérologue supplémentaire liée à une extrémité. Le
5 terme dérivé comprend également les polypeptides homologues aux polypeptides décrits dans la présente invention, issus d'autres sources cellulaires et notamment de souches productrices de Streptogramines.

L'invention a également pour objet toute cellule recombinante contenant une séquence nucléotidique ou un vecteur tel que défini ci-avant. Les cellules
10 recombinantes selon l'invention peuvent être aussi bien des cellules eucaryotes que procaryotes. Parmi les cellules eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia, Schwanniomyces, ou Hansenula. S'agissant de cellules animales, on peut citer les
15 cellules COS, CHO, C127, les oeufs de Xénope, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement Micromonospora, Aspergillus ssp. ou Trichoderma ssp. Comme cellules procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes Actinomycètes, E.coli, Bacillus, et notamment Streptomyces. Préférentiellement, les cellules recombinantes de l'invention sont choisies parmi les cellules productrices de
20 Streptogramines (Cf tableau 1). Les cellules recombinantes de l'invention peuvent être obtenues par toute méthode permettant d'introduire une séquence nucléotidique étrangère dans une cellule. Il peut s'agir notamment de transformation, électroporation, conjugaison, fusion de protoplastes, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art.

25 L'invention a encore pour objet un procédé de production d'un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines selon lequel on cultive une cellule recombinante telle que définie ci-avant et on récupère le polypeptide produit.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une cellule recombinante telle que définie ci-avant exprimant un polypeptide au moins impliqué dans la biosynthèse
30 des Streptogramines, dans une réaction de bioconversion. En particulier, ces cellules peuvent permettre de transformer une Streptogramine en une forme dérivée. Par exemple, la Pristinamycine IIB peut être, de cette manière, transformée en Pristinamycine IIA. Le même raisonnement peut être appliqué à tout intermédiaire de

biosynthèse. Ces cellules peuvent également permettre de fabriquer des antibiotiques hybrides ayant des propriétés pharmacologiquement intéressantes (Hopwood *et al.* 1985a, Hopwood *et al.* 1985b, Hutchinson *et al.* 1989). Ces bioconversions peuvent se faire soit à l'aide de cellules entières, soit à l'aide d'extraits acellulaires des dites
5 cellules.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'une séquence nucléotidique telle que définie ci-avant pour amplifier la production de Streptogramine. L'invention concerne également un procédé de production de Streptogramines selon lequel on introduit et/ou on amplifie dans une cellule
10 productrice de Streptogramines ou potentiellement productrice de Streptogramines une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'invention, on cultive ladite cellule dans des conditions de production des Streptogramines, et on récupère les Streptogramines produites.

La surexpression de certains gènes impliqués dans la biosynthèse peut permettre
15 l'augmentation de la production des Streptogramines A et/ou B des souches productrices. Cette surproduction peut se faire dans plusieurs souches : soit des souches qui ne produisent que des molécules de la famille des Streptogramines A, soit des souches qui ne produisent que des molécules de la famille des Streptogramines B, soit des souches qui produisent les deux composants A et B. Ces surexpressions
20 peuvent résulter de l'augmentation du taux de synthèse, donc de la productivité, des composants A et/ou B soit en erlenmeyer, soit en petits fermenteurs, soit en gros fermenteurs industriels. Par ailleurs, la surexpression spécifique d'un gène impliqué dans la biosynthèse d'un composant A ou B permet également de faire varier le % de composants A et B produits par la souche, et ainsi d'obtenir une meilleure synergie
25 entre ces molécules. En outre, les gènes de biosynthèse isolés à partir d'un microorganisme producteur de Streptogramines peuvent être utilisés pour amplifier la production dans un autre microorganisme producteur.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de préparation de cellules bloquées dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines selon lequel
30 on effectue, sur une cellule productrice de Streptogramines, une mutagénèse au niveau d'un gène au moins de la voie de biosynthèse.

Préférentiellement, la mutagenèse est effectuée in vitro ou in situ, par suppression, substitution, délétion et/ou addition d'une ou plusieurs bases dans le gène considéré, ou par disruption génique.

Un autre aspect de la présente invention réside en effet dans la construction de mutants bloqués dans certaines étapes de biosynthèse des Streptogramines. L'intérêt réside d'une part dans l'étude de la fonctionnalité des protéines mutées et d'autre part dans la réalisation de souches produisant des intermédiaires de biosynthèse. Ces intermédiaires peuvent être modifiés, éventuellement après séparation, soit par ajout de composants particuliers dans les milieux de production, soit par introduction dans les souches ainsi mutées d'autres gènes susceptibles de modifier l'intermédiaire en s'en servant de substrat. Ces intermédiaires peuvent ainsi être modifiés par voie chimique, biochimique, enzymatique et/ou microbiologique. Dans ce cadre, le mutant SP92::pVRC505 de la souche S.pristinaespiralis SP92 a été construit : S.pristinaespiralis SP92::pVRC505 a été isolée par intégration homologue dans le gène снаА d'un plasmide suicide pVRC505, construit à partir du vecteur pDH5 et d'un fragment interne au gène снаА.

L'invention concerne donc également un procédé de préparation d'un intermédiaire de biosynthèse des Streptogramines selon lequel :

- on prépare une cellule bloquée dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines telle que décrite ci-avant,
- on cultive ladite cellule, et
- on récupère l'intermédiaire accumulé.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une molécule dérivée des Streptogramines selon lequel :

- on prépare une cellule bloquée dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines telle que décrite ci-avant,
- on cultive ladite cellule, et,
- on modifie l'intermédiaire accumulé par cette cellule, éventuellement après séparation du milieu de culture.

La présente invention est illustrée à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Exemple de structure des composants A des Streptogramines.

Figure 2 : Exemple de structure des composants B des Streptogramines.

Figure 3 : Autres exemples de structures de Streptogramines.

5 Figure 4 : Représentation du cosmide pIBV1.

Figure 5 : Représentation du cosmide pIBV2.

Figure 6 : Réaction catalysée par la Pristinamycine IIA-synthase.

Figure 7 : Réaction catalysée par l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.

Figure 8 : Représentation des plasmides pVRC402 (A) et pVRC501 (B).

10 Figure 9 : Représentation du plasmide pXL2045.

Figure 10 : Représentation du plasmide pVRC505.

Figure 11 : Représentation du plasmide pVRC507.

Matériels:

Bio-Sil SEC 125 et 250 (Bio-Rad)

15 Centricon 10 (Amicon)

Centriprep 10 (Amicon)

FMN agarose (Sigma)

MonoQ HR 5/5 et 10/10 (Pharmacia)

PD-10 (Pharmacia)

20 Phenyl Sepharose (Pharmacia)

Phenyl Superose HR 10/10 (Pharmacia)

Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia)

Sephadex G25 Fine (Pharmacia)

Superose 12 prep grade (Pharmacia)

25 Vydac C4 et C18 (The Separations Group)

EXEMPLE 1 : Isolement de l'ADN total de la souche Streptomyces pristinaespiralis SP92.

Cet exemple illustre comment l'ADN de S. pristinaespiralis SP92 peut être purifié.

30 La souche Streptomyces pristinaespiralis SP92 dérive de la souche Streptomyces pristinaespiralis DS5647 (ATCC25486).

50 ml de milieu YEME (34% de sucrose, 5 mM MgCl₂, glycine 0.25% (D. Hopwood *et al.* 1985)) sont inoculés avec 10⁸ spores de *S.pristinaespiralis* SP92 et la culture est incubée 40 heures à 30°C, sous agitation de 280 tours/mn.

Le mycélium est récolté et lavé avec 15 ml de saccharose 10.3 %. Environ 1 g
5 du culot de mycélium est repris par 5 ml de TE complémenté par 34 % de sucrose, auxquels sont ajoutés, 1 ml de lysozyme à 50 mg/ml dans une solution de Tris-HCl 0.01 M pH8 et 1 ml d'EDTA 0.25 M pH8. Après incubation à 30°C pendant une durée de 30 à 60 mn, le mélange est éclairci par 0.8 ml de sarkosyl 10 %. Puis sont ajoutés, 2 ml d'EDTA 0.25 M pH8, 10 ml de TE, 18 g de CsCl et 1.2 ml de BET 10
10 mg/ml. La préparation est ultracentrifugée pendant une nuit à 55 000 tours/mn, à 20°C.

L'ADN chromosomique présent dans le gradient de CsCl sous forme d'une bande, est récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur. Le BET est éliminé par plusieurs lavages avec une solution d'isopropanol saturée par du tampon TE, 5 M NaCl. L'ADN
15 est précipité par ajout de 3 volumes de TE et 4 volumes d'isopropanol. Après lavage à l'éthanol 70 %, l'ADN est repris dans un volume approprié de TE. La quantité d'ADN total obtenu varie entre 250 et 500 µg par g de mycélium.

EXEMPLE 2 : Isolement d'ADN plasmidique d'*E.coli* :

Cet exemple illustre comment l'ADN plasmidique d'*E.coli* est préparé à partir
20 des souches d'*E.coli* recombinantes

2.1. Préparation d'ADN plasmidique d'*E.coli* en grosses quantités :

Cet exemple illustre comment les maxipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées chez *E.coli*.

Cette préparation est effectuée à partir d'une culture de 500 ml en milieu LB
25 contenant 150 µg/ml d'ampicilline. Le protocole d'extraction est dérivé des méthodes décrites par Birnboim et Doly (1979) et Ish-Horowicz et Burke (1981) et est décrit dans Maniatis *et al.* (1989).

Après cette extraction, l'ADN plasmidique est purifié par gradient de CsCl, comme décrit dans Maniatis *et al.* (1989). L'ADN plasmidique est ensuite précipité
30 par ajout de 3 volumes de TE et 4 volumes d'isopropanol. Après centrifugation, le culot est repris dans 0.5 à 1 ml de TE.

2.2. Préparation d'ADN plasmidique d'*E.coli* en petites quantités :

Cet exemple illustre comment les minipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées chez E.coli.

Cette préparation est réalisée à partir de 1.5 ml de culture en milieu LB contenant 150 µg/ml d'ampicilline. La procédure est celle décrite par Birnboim et
5 Doly (1979).

EXEMPLE 3 : Construction de la banque d'ADN génomique de S.pristinaespiralis SP92 chez E.coli.

Cet exemple illustre comment une banque d'ADN génomique de S.pristinaespiralis SP92 est réalisée chez E.coli.

10 **3.1. Préparation des fragments d'ADN génomique :**

Cet exemple illustre comment des fragments d'ADN génomique de haut poids moléculaire peuvent être préparés.

L'ADN total de la souche SP92, préparé comme décrit dans l'exemple 1, est digéré partiellement par Sau3A (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510
15 USA) dans le tampon préconisé par le fournisseur : 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA. La quantité d'enzyme utilisée pour obtenir des fragments d'ADN de haut poids moléculaire, a été déterminée empiriquement. Environ 0.025 unités d'enzyme sont utilisées pour digérer 1 µg d'ADN total pendant 20 mn à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée par une incubation de 15 mn à 65°C et
20 l'enzyme éliminée par l'addition d'un volume égal de phénol-chloroforme. Après centrifugation, le surnageant contenant l'ADN total partiellement digéré est précipité par ajout d'acétate de sodium 0.3 M final et 2.5 volumes d'éthanol.

Environ 100 µg d'ADN total sont ainsi digérés, puis les fragments d'ADN de taille comprise entre 30 et 50 kb sont isolés par gradient de sucrose 10-40 %. Leur
25 taille est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,4 %.

3.2. Préparation du cosmide pH79 :

Cet exemple illustre comment le cosmide pH79 est préparé à partir d'E. coli.

Le cosmide pH79 (Hohn, B. and Collins, 1980) comprend une partie de pBR322 (Bolivar, F. et al., 1977), la région cro-cII de λ et la région contenant la
30 séquence cos de Charon 4A (Blattner, F.R. et al., 1977).

- L'extraction du cosmide a été réalisée comme décrit dans l'exemple 2.1., à partir d'une souche d'E.coli TG1 (K12, Δ (lac-pro) supE thi hsd DS F' traD36 proA⁺B⁺ lacI^q LacZ Δ M15, Gibson, 1984).

5 500 ng de cosmide pHc79 ont été digérés par BamHI (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 USA) dans 20 μ l de tampon 150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH7.9), 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-mercaptoéthanol, 100 μ g/ml BSA.

3.3. Ligation des fragments d'ADN et du cosmide :

Cet exemple illustre comment les fragments du génome de S.pristinaespiralis SP92, issus d'une digestion Sau3A, peuvent être ligaturés avec le vecteur pHc79
10 linéarisé par BamHI.

Environ 150 ng de cosmide linéarisé comme décrit plus haut ont été précipités à l'éthanol avec 350 ng de fragments d'ADN total de S.pristinaespiralis SP92 préparés comme décrit à l'exemple 3.2. Le culot a été repris dans 10 μ l de tampon de ligation :
15 50 mM Tris-HCl pH7.8, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM ATP, 50 μ g/ml de BSA et 0.5 μ l de T4 DNA Ligase à 400 000 unités par ml (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 USA) ont été ajoutés. L'incubation a été réalisée durant une nuit à 15°C.

3.4. Réalisation de l'encapsidation in vitro:

Cet exemple illustre comment les cosmides construits en 3.3 sont encapsidés in
20 vitro.

L'encapsidation des cosmides hybrides après ligation a été réalisée à partir du kit Gigapack II Gold, développé par Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA).

25 2x4 μ l de mélange de ligation, soit 2x70 ng de cosmides hybrides ont été encapsidés in vitro selon la procédure décrite par le fournisseur.

3.5. Transfection des souches d'E.coli DH1 et HB101 :

Cet exemple illustre comment les cosmides sont introduits chez E.coli.

Deux transfections en parallèle ont été réalisées avec les souches d' E.coli DH1 (F⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 supE44L⁻, Low 1968) et HB101 (F⁻ supE44 hsdS20(rB⁻mB⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1,
30 Boyer et Roulland-Dussoix 1969).

Les cellules ont été préparées selon le protocole suivant : une préculture de 100 ml est réalisée en milieu LB complémenté par 0.2 % Maltose et 10 mM MgSO₄, pendant 4 à 5 heures jusqu'à ce que la DO600 atteigne la valeur de 0.8. La culture est alors centrifugée et le culot repris dans 40 ml de MgSO₄ 10 mM et dilué jusqu'à

5 DO600=0.5, dans la même solution. 200 µl de la suspension cellulaire ainsi préparée sont mélangés à 100 µl de mélange d'encapsulation. Après 20 mn de contact à 37°C, 1 ml de LB est ajouté et l'ensemble est incubé 1 hr à 37°C. Les transfectants sont ensuite sélectionnés sur milieu LB solide contenant 150 µg/ml d'ampicilline. Le nombre de transfectants obtenus est d'environ 10⁴ par µg de cosmide recombinant.

10 3.6. Stockage des banques d'ADN génomique de *S.pristinaespiralis* SP92 :

Cet exemple illustre comment les banques d'ADN génomique de *S.pristinaespiralis* SP92 sont conservées.

Après vérification de la taille moyenne des fragments insérés dans le cosmide pH79, environ 1500 colonies issues de chacune des transfections réalisées avec les

15 souches HB101 et DH1 sont repiquées dans des plaques de micro-titration à 96 puits contenant 200 µl de milieu Hogness (milieu LB complémenté avec 8.8 % glycérol, 3 mM sodium acétate, 55 mM K₂HPO₄, 26 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 15 mM (NH₄)₂SO₄, ampicilline 150 µg/ml). Ces plaques sont incubées une nuit à 37°C puis stockées à -80°C.

20 **EXEMPLE 4 : Préparation des membranes d'hybridation à partir des banques génomiques de *S. pristinaespiralis* SP92 :**

Cet exemple illustre comment l'ADN des colonies constituant les banques génomiques de *S. pristinaespiralis* SP92 est transféré sur une membrane d'hybridation.

25 Ces membranes d'hybridation ont été réalisées en double pour chacune des 2 banques, selon le protocole suivant :

Les 15 plaques de micro-titration de chaque banque sont répliquées à l'aide d'une brosse à clous sur milieu LB agar contenant 150 µg d'ampicilline par ml. Après une nuit de croissance à 37°C, le transfert des colonies est effectué sur membrane

30 Biohylon Z⁺ (Bioprobe System) selon le protocole suivant : la membrane découpée à la taille adéquate est laissée au contact des colonies pendant 1 mn. Puis une dénaturation est effectuée par imbibation de la membrane avec une solution de NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M pendant 5 mn, suivie d'une neutralisation par imbibation de la

membrane dans une solution d'acétate de sodium 3 M pendant 5 mn. L'ADN est fixé sur la membrane par exposition sous une lampe UV pendant 5 mn.

EXEMPLE 5 : Isolement de cosmides portant les gènes codant pour des protéines purifiées impliquées dans la biosynthèse des Streptogramines :

5 Cet exemple décrit comment, à partir d'une protéine purifiée intervenant dans la biosynthèse des Pristinamycines, dont la séquence NH₂-terminale, ou une séquence interne ont été établies, il est possible d'isoler à partir des banques génomiques précédemment réalisées, un cosmide portant le gène de structure de cette même protéine.

10 5.1. Isolement du cosmide pIBV1 portant les gènes de structure des deux sous-unités de la Pristinamycine IIA synthase.

5.1.1. Identification et purification d'une des protéines impliquées dans l'étape finale de la synthèse des Pristinamycines II : la Pristinamycine IIA synthase.

15 Comme il a été indiqué dans l'introduction, la dernière étape de synthèse de la Pristinamycine IIA correspond à une oxydation de la liaison 2-3 de la D-proline en déhydroproline. La protéine responsable de cette activité a été purifiée jusqu'à homogénéité comme l'illustre cet exemple.

5.1.1.A. Dosage de l'activité Pristinamycine IIA synthase

20 Cet exemple illustre le dosage d'une activité de la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IIA qui n'a encore jamais été décrite et qui possède la propriété remarquable de n'être exprimée que pendant la période de production des Pristinamycines. Il s'agit de la Pristinamycine IIA synthase qui catalyse la conversion de la Pristinamycine IIB en Pristinamycine IIA par oxydation du résidu D-proline de la Pristinamycine IIB en résidu 2-3 déhydroproline (figure 6) en présence d'oxygène
25 moléculaire et de FMNH₂. Les fractions enzymatiques à doser (0,002 à 0,005 unités) sont incubées 1 h à 27°C dans un volume total de 500 µl de tampon bis-tris-propane 50 mM pH 6,8 contenant NADH (500 µM), FMN (5 µM), Pristinamycine IIB (20 µM) et 0,02 unités de FMN réductase (Boehringer Mannheim).

30 La Pristinamycine IIA formée est dosée par CLHP après l'arrêt de l'incubation par ajout de 500 µl d'acide chlorhydrique 0,1 N et 500 µl d'acétonitrile, et une centrifugation de l'échantillon pendant 5 minutes à 5 000 g. 150 µl du surnageant de

centrifugation sont injectés sur une colonne Nucléosil 5-C8 de 15 cm éluee par un mélange de 34 % CH₃CN et 66 % tampon phosphate 0,1 M pH 2,9. Les Pristinamycines IIA et IIB sont détectées grâce à leur absorbance UV à 206 nm.

L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme
5 nécessaire pour synthétiser 1 µmole de Pristinamycine IIA par heure dans les conditions décrites.

5.1.1.B. Purification de la Pristinamycine IIA synthase de S. pristinaespiralis SP92.

Cette expérience illustre comment une enzyme de S. pristinaespiralis SP92
10 intervenant dans la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IIA peut être purifiée.

En utilisant le dosage décrit précédemment à l'exemple 5.1.1.A la purification de la Pristinamycine IIA synthase est réalisée comme décrit ci-dessous en prenant soin de congeler et conserver les fractions actives à -30°C entre chaque étape si nécessaire.

15 150 g d'un culot de centrifugation, lavé par un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 à 10 % v/v de glycérol, d'une culture de S. pristinaespiralis SP92 récoltée en début de phase de production des Pristinamycines sont repris par 450 ml de tampon bis-tris-propane 50 mM pH 6,8 contenant 5 mM de DTT et 0,2 mg/ml de lysozyme. La suspension ainsi obtenue est incubée pendant 45 minutes à 27°C puis centrifugée à
20 50 000 g durant 1 heure. L'extrait brut ainsi recueilli est fractionné par précipitation au sulfate d'ammonium. La fraction protéique précipitant entre 40 et 55 % de saturation est déssalée sur une colonné de Sephadex G25 Fine puis injectée (100 mg par injection) dans le tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM sur une colonne MonoQ HR 10/10. Les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de KCl
25 (0 à 0,5M). Les fractions contenant l'activité enzymatique (mises en évidence grâce au test décrit à l'exemple 5.1.1.A) sont regroupées et concentrées à 20 ml sur Centriprep 10. Après dilution par un volume de tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM contenant 2 M de sulfate d'ammonium, les protéines sont chromatographiées (22,5 mg par injection) sur une colonne Phenyl Superose HR
30 10/10 avec un gradient décroissant de sulfate d'ammonium (1,0 M à 0 M). Les meilleures fractions contenant l'activité recherchée sont rassemblées, reconcentrées à 1 ml sur Centriprep 10, puis appliquées (200 µl par injection) sur une colonne Bio-Sil SEC 250. Le pic d'activité est détecté dans cette technique à un poids moléculaire centré à 77 000. La fraction contenant l'activité est injectée sur une colonne MonoQ

HR 5/5 dans le tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM éluée avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,5M).

Après cette étape, l'enzyme est pure et en électrophorèse PAGE-SDS, deux sous unités de poids moléculaire estimé à 35 000 et 50 000 sont mises en évidence. Elles sont séparées sur colonne Vydac C4 de 25 cm éluée avec un gradient linéaire de 30 à 50 % de CH₃CN dans l'eau à 0,07 % d'acide trifluoroacétique.

Tableau: Purification de la Pristinamycine IIA synthase

tapes de Purification	vol. (ml)	Protéines (mg)	Act. Spé. μ mole/h/mg	Rendement	Facteur de purification
Extrait brut	490	1690	0,14	100	1
40-55% sulf.	60	1050	0,19	85	1,4
MonoQ 10/10	95	45	3,0	58	21
Phenylsuperose	8	2,8	12	14	86
BioSil SEC	5	1,3	18	14	130
MonoQ 5/5	10	0,7	23	10	160

Le facteur de purification est calculé d'après l'augmentation de l'activité spécifique des fractions au cours de la purification.

5.1.2. Réalisation d'oligonucléotides à partir des séquences protéiques :

Cet exemple décrit comment à partir des séquences NH₂-terminales des deux sous-unités de la Pristinamycine IIA-synthase purifiée comme décrit dans l'exemple 5.1.1B, il est possible de synthétiser des oligonucléotides. Les deux sous-unités de la Pristinamycine IIA synthase sont appelées SnaA et SnaB et correspondent aux polypeptides de poids moléculaire de 50000 et 35000 respectivement tel que cela est décrit à l'exemple 5.1.1.B

Les séquences NH₂-terminales des protéines SnaA et SnaB, correspondant aux sous unités de la Pristinamycine IIA-synthase, ont été réalisées par micro-séquençage. Ceci est fait par la technique de dégradation d'Edman, en utilisant un séquenceur automatisé (Applied Biosystems modèle 407A) couplé à un appareil CLHP pour l'identification des dérivés phénylthiohydantoïnes. Une trentaine de résidus ont été déterminés pour chacune d'entre elles.

Protéine SnaA : (Cf résidus 2 à 29 sur SEQ ID n° 3)

T A P(R)(R,W)R I T L A G I I D G P G G H V A A(W)R H P (A) T

Protéine SnaB : (Cf résidus 2 à 31 sur SEQ ID n° 5)

T A P I L V A T L D T R G P A A T L G T I T(R)A V(R)A A E A

- 5 Par ailleurs des séquences internes à ces deux polypeptides ont été déterminées après digestions trypsiques de SnaA et SnaB et purification des fragments obtenus sur colonne Vydac C18. Les séquences internes suivantes ont été trouvées:

Protéine SnaA : (Cf résidus 365 à 384 sur SEQ ID n° 3)

G A D G F N I D F P Y L P G S A D D F V

Protéine SnaB : (Cf résidus 122 à 136 sur SEQ ID n° 5)

G L (-) D S F D D D A F V H D R

- 5 A partir des régions soulignées dans chacune des séquences des fragments internes aux protéines SnaA et SnaB et, en fonction de la dégénérescence du code génétique spécifique des Streptomyces (cf. Exemple 8), les mélanges d'oligonucléotides suivants ont été synthétisés par un synthétiseur automatisé Biosearch 8600. Ils ont ensuite été purifiés par la technique déjà décrite (Sawadogo
- 10 M. et Von Dyke M. W., 1991). Les gènes snaA et snaB désignent les gènes de structure des protéines SnaA et SnaB respectivement.

Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence interne de SnaA :

ATC GAC TTC CCC TAC CTC CCC GG
 T T G T G G
 15 A
 T

Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence interne de SnaB :

TTC GAC GAT GAT GCA TTC GTC CAT GAC
 C C T G C
 20 C
 G

- 5.1.3. Marquage des mélanges d'oligonucléotides synthétiques et hybridation avec les banques d'ADN génomique de la souche SP92:

- Cet exemple décrit comment des oligonucléotides spécifiques d'un gène de biosynthèse des Pristinamycines peuvent être marqués radioactivement puis hybridés avec des membranes sur lesquelles l'ADN des banques génomiques de S.pristinaespiralis SP92 a été transféré.
- 25

- Le marquage des oligonucléotides est réalisé par transfert en position 5' terminale, d'un groupe phosphate marqué au $\gamma^{32}\text{P}$, par la T4 polynucléotide kinase.
- 30 Ce marquage est réalisé comme indiqué dans Maniatis et al. (1989). Après le marquage, les oligonucléotides sont utilisés sans purification.

Environ 2 X 500 ng de chaque mélange d'oligonucléotides ont été ainsi marqués au $\gamma^{32}\text{P}$ et ont été utilisés pour hybrider chacune des deux banques.

L'hybridation des membranes de chaque banque est réalisée selon un protocole dérivé de ceux développés par Meinkoth, J. and Wahl, G. (1984) et Hames, B.D. and Higgins, S.J. (1985) : les 15 membranes sont préhybridées pendant 3 hrs à 50°C dans 40 ml d'une solution contenant : DenhardtX5 (DenhardtX100 : 2 % (p/v) Ficoll, 2 % (p/v) polyvinyl-pyrrolidone, 2 % (p/v) BSA), SSCx5 (SSCx20 : NaCl 3 M, citrate de sodium 0.3 M), NaPO₄ pH6.5 50 mM, SDS 0.1 %, ADN de sperme de saumon 250 µg/ml.

L'hybridation est ensuite réalisée pendant une nuit à 50°C, dans 20 ml de la même solution auxquels sont ajoutés les 500 ng d'oligonucléotides marqués.

Les filtres sont ensuite lavés dans une solution de SSCx6 et SDS 0.5 %, 2 fois 30 mn à température ambiante puis de façon empirique à des températures graduellement plus élevées (50 à 65 °C). La température de ces derniers lavages est progressivement augmentée après des expositions autoradiographiques successives afin de déterminer la spécificité des clones hybridants avec les mélanges d'oligonucléotides.

5.1.4. Isolement du cosmide pIBV1 et détermination des régions contenant les gènes snaA et snaB :

Cet exemple illustre comment il est possible d'obtenir un cosmide, tel que construit à l'exemple 3, contenant des gènes de biosynthèse des Pristinamycines.

Le cosmide pIBV1 a été isolé d'un clone de la banque réalisée dans la souche HB101, ayant hybridé simultanément avec les deux mélanges d'oligonucléotides préparés dans l'exemple 5.1.2.

Ce cosmide a été purifié comme décrit dans l'exemple 2. Il contient un insert d'ADN génomique de S.pristinaespiralis SP92 dont la taille a été estimée à 36 kb.

Une cartographie (figure 4) a été établie à partir de digestions avec différentes enzymes de restriction, selon les protocoles du fournisseur (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 USA).

Des hybridations en Southern de l'ADN de pIBV1 digéré par différentes enzymes, avec les mélanges d'oligonucléotides, ont permis d'identifier la région de ce cosmide contenant les gènes snaA et snaB.

Les Southern ont été réalisés comme décrit dans Maniatis *et al.* (1989). Après séparation des fragments de restriction par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 %, l'ADN est transféré sur membrane Biohylon Z⁺ (Bioprope System). L'hybridation de

l'ADN ainsi transféré sur les membranes avec les mélanges d'oligonucléotides a été réalisée comme décrit dans l'exemple 5.1.3.

Ces Southern ont permis de montrer que le cosmide pIBV1 possédait un fragment BamHI de 6 kb contenant les séquences homologues aux sondes synthétisées dans l'exemple 5.1.2.

5.2. Isolement du cosmide pIBV2 contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase (snbA).

Cet exemple illustre comment il est possible d'obtenir un cosmide, tel que construit à l'exemple 3, contenant au moins un gène de biosynthèse des Pristinamycines I.

5.2.1. Identification et purification de la protéine impliquée dans l'activation de l'acide 3-hydroxypicolinique.

Cet exemple illustre comment la protéine responsable de l'activation de l'acide 3-hydroxypicolinique peut-être purifiée jusqu'à homogénéité, à partir de S.pristinaespiralis SP92.

5.2.1.A. Dosage de l'activité acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase

Cet exemple illustre le dosage d'une activité de la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA qui n'a encore jamais été décrite et qui possède la propriété remarquable de n'être exprimée que pendant la période de production des Pristinamycines. Il s'agit de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase qui catalyse la formation de l'adenylate de l'acide 3-hydroxypicolinique (figure 7) à partir de cet acide libre et de l'ATP en présence de MgCl₂.

Les fractions enzymatiques à doser (0,002 à 0.020 unités) sont incubées pendant 15 min à 27°C dans un volume total de 250 µl de tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM, 10 % v/v de glycérol, en présence d'acide 3-hydroxypicolinique (1mM), ATP (2mM), MgCl₂ (5mM) et tetrasodium pyrophosphate marqué avec l'isotope 32 radioactif de l'atome de phosphore (200 µM).

La réaction est arrêtée par ajout de 1 ml d'une suspension de charbon activé à 10 g/l dans un mélange de 75 % de tetrasodium pyrophosphate 0,1 M et 25 % d'acide perchlorique à 14 %. Après agitation le charbon est recueilli et lavé par deux fois 1 ml du mélange pyrophosphate-acide perchlorique. Les molécules organiques

radioactives sont alors éluées par trois fois 1 ml d'un mélange de 50 % de méthanol et 50 % d'ammoniaque N, dans une fiole de comptage contenant 12 ml d'eau. La radioactivité est mesurée par effet Cerenkov avec un compteur à scintillation (Minaxi TriCarb 4000 PACKARD).

- 5 L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour incorporer 1 μ mole de pyrophosphate dans l'ATP en 1 heure dans les conditions décrites ci-dessus.

5.2.1.B. Purification de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase de S. pristinaespiralis SP92.

- 10 Cette expérience illustre comment une enzyme de S. pristinaespiralis SP92 intervenant dans la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA peut être purifiée.

- En utilisant le dosage décrit précédemment à l'exemple 5.2.1.A, la purification de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase est réalisée comme décrit ci-dessous en prenant soin de congeler à -70°C les fractions actives et de les conserver à -30°C
15 entre chaque étape si nécessaire.

- 234 g d'un culot de centrifugation, lavé par un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 à 10 % v/v de glycérol, d'une culture de S. pristinaespiralis SP92 récoltée en début de phase de production des Pristinamycines sont repris par 234 ml de tampon pH 8 tris-HCl 100 mM contenant 4 mM DTE, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v
20 glycérol et 0,6 mg/ml de lysozyme. La suspension ainsi obtenue est incubée pendant 30 minutes à 27°C puis centrifugée à 50 000 g durant 1 heure. L'extrait brut ainsi recueilli est injecté dans le tampon pH 8 tris-HCl 100 mM, DTE 4 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol sur une colonne (80 ml) de Q-Sepharose Fast Flow. Les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de KCl (0
25 à 0,4 M). Les fractions contenant l'activité enzymatique (mises en évidence grâce au test décrit à l'exemple 5.2.1.A) sont regroupées et diluées par un volume de tampon pH 8 tris-HCl 100 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol contenant 2 M de sulfate d'ammonium. Les protéines sont alors chromatographiées sur une colonne (50 ml) de Phenyl Sepharose avec un gradient décroissant de sulfate
30 d'ammonium (1,0 M à 0 M) dans le tampon pH 8 tris-HCl 100 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol. Après ajout de 4 mM DTE, les fractions actives sont rassemblées, reconcentrées à 5 ml sur Centriprep 10, puis appliquées sur une colonne (100 ml) de Superose 12 prep grade. Les fractions contenant l'activité recherchée sont regroupées et injectées dans le tampon pH 8

tris-HCl 100 mM, DTE 4mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol (environ 6 mg par injection) sur une colonne de MonoQ HR 5/5 éluée avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,4 M). Les fractions actives sont regroupées, concentrées à 1 ml sur Centricon 10, diluées par 3 volumes de tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTE 4 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol, puis injectées (2 mg par injection) dans ce dernier tampon sur une colonne de MonoQ HR 5/5 éluée avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,3 M). Les meilleures fractions contenant la ligase recherchée sont regroupées, puis appliquées dans le tampon pH 6,8 phosphate de sodium 20 mM, sulfate de sodium 50 mM sur une colonne Bio-Sil SEC 250. Le pic d'activité est détecté dans cette technique à un poids moléculaire centré à 60 000.

La protéine possédant l'activité d'activation de l'acide 3-hydroxypicolinique est désignée par la suite SnbA.

Après cette étape, l'enzyme est pure et en électrophorèse PAGE-SDS son poids moléculaire est estimé à environ 67 000.

Tableau: Purification de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase

Etapas de Purification	vol. (ml)	Protéines (mg)	Act. Spé. $\mu\text{mole/h/mg}^a$	Rendement	Facteur de purification
Extrait brut	246	2050	(0,06)		
Q-Sepharose	40	188	0,47	100	1
Phenylsepha.	70	35	2,21	88	4,7
Superose 12	16	17	2,03	39	4,3
MonoQ pH 8	4,5	9,0	2,09	21	4,5
MonoQ pH 6,8	1	2,0	2,9	6,6	6,2
Bio-Sil 250	2,5	0,23	12,4	3,2	26

^a L'activité dans l'extrait brut ne peut pas être mesurée précisément à cause d'échanges entre le pyrophosphate et l'ATP non spécifiques de l'acide 3-hydroxypicolinique.

Le facteur de purification est calculé d'après l'augmentation de l'activité spécifique des fractions au cours de la purification.

5.2.2. Réalisation d'oligonucléotides à partir de la séquence protéique:

Cet exemple décrit comment à partir des séquences NH₂-terminale et interne de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase, il est possible de synthétiser des oligonucléotides.

La séquence NH₂-terminale de la protéine SnbA a été réalisée par micro-séquençage comme décrit dans l'exemple 5.1.2. Une vingtaine de résidus ont été ainsi identifiés.

Une séquence interne à la protéine SnbA, d'environ 20 acides aminés, a également été identifiée, après hydrolyse trypsique et purification des fragments obtenus sur colonne Vydac C18.

10 Séquence NH₂-terminale de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase :
(Cf résidus 1 à 21 sur SEQ ID n° 9)

M L D G S V P W P E D V A A K Y R A A G Y

Séquence interne de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase:
(Cf. résidus 448 à 467 sur SEQ ID n° 9)

15 V S A (-) E V E G H L G A H P D V Q Q A A

A partir des régions soulignées dans chacune des séquences et en fonction de la dégénérescence du code génétique spécifique des Streptomyces (cf. Exemple 8), les mélanges d'oligonucléotides suivants ont été synthétisés :

20 Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence NH₂-terminale de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase :

5' 3'
GTC CCC TGG CCC GAG GAC GTC GCC GCC AAG TAC
G G G G G G

25 Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence interne de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase :

5' 3'
GAG GTC GAG GGC CAC CTC GGC GCC CAC CCC GAC GTC CAG CAG GC
G G G G G G G

5.2.3. Marquage des mélanges d'oligonucléotides synthétiques et hybridation des banques d'ADN génomique de S.pristinaespiralis SP92 :

Cet exemple décrit comment des oligonucléotides spécifiques d'un gène de biosynthèse des Pristinamycines peuvent être marqués radioactivement puis hybridés avec des membranes sur lesquelles l'ADN des banques génomiques de S.pristinaespiralis a été transféré.

Le marquage des oligonucléotides est réalisé par transfert en position 5' terminale, d'un groupe phosphate marqué au $\gamma^{32}\text{P}$, par la T4 polynucléotide kinase, comme indiqué dans l'exemple 5.1.3.

Environ 2X500 ng de chaque mélange d'oligonucléotides ont été ainsi marqués au $\gamma^{32}\text{P}$ et ont été utilisés pour hybrider chacune des deux banques.

L'hybridation des membranes de chaque banque a été réalisée comme indiqué dans l'exemple 5.1.3.

5.2.4. Isolement du cosmide pIBV2 et détermination de la région contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase :

Cet exemple illustre comment il est possible d'obtenir un cosmide, tel que construit à l'exemple 3, contenant au moins le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.

Le cosmide pIBV2 a été isolé d'un clone de la banque réalisée dans la souche d'E.coli DH1, ayant hybridé avec les deux mélanges d'oligonucléotides simultanément.

Ce cosmide a été purifié comme décrit dans l'exemple 2. Il contient un insert d'ADN génomique de S.pristinaespiralis SP92 dont la taille a été estimée à 47 kb. Une cartographie (figure 5) a été établie à partir de digestions avec différentes enzymes de restriction, comme indiqué dans l'exemple 5.1.4.

Des hybridations en Southern de l'ADN de pIBV2 digéré par différentes enzymes, avec les mélanges d'oligonucléotides, ont permis d'identifier la région contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase. Les Southern et les hybridations ont été réalisés comme décrit dans l'exemple 5.1.4.

Les résultats d'hybridation ont permis de montrer que le cosmide pIBV2 possédait un fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb, contenant la séquence homologue aux sondes synthétisées dans l'exemple 5.2.2.

EXEMPLE 6 : Sous clonage des fragments d'ADN clonés dans des cosmides tels que préparés dans l'exemple 3 et contenant les gènes d'intérêt.

Cet exemple illustre comment à partir des cosmides construits comme décrit à l'exemple 3 et contenant des gènes de biosynthèse des Pristinamycines II ou des Pristinamycines I, il est possible de sous cloner des fragments d'ADN contenant ces gènes.

Ces sous clonages ont été effectués afin de pouvoir réaliser ultérieurement la séquence nucléique des gènes identifiés ainsi que les différentes constructions présentées dans les exemples suivants.

10 6. 1. Isolement du fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV2, contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase, il est possible de sous cloner un fragment d'ADN de taille inférieure, contenant ce gène.

15 Environ 10 µg du cosmide pIBV2 ont été coupés successivement par les enzymes de restriction BglII et EcoRI (New England Biolabs) dans les conditions préconisées par le fournisseur. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et le fragment BglII-EcoRI de 5.5 kb a été isolé par électroélution comme décrit dans Maniatis *et al.* (1989).

20 Environ 100 ng de pUC19 (Viera et Messing 1982) coupés par BamHI et EcoRI ont été ligaturés avec 200 ng du fragment BglII-EcoRI de 5,5 kb, dans les conditions décrites dans l'exemple 3.3.

Après transformation de la souche TG1 et sélection des transformants sur milieu LB solide contenant 150 µg/ml d'ampicilline et 20 µg/ml de X-gal, selon la technique décrite par Maniatis *et al.* (1989), un clone portant le fragment souhaité a été isolé. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC402. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 8(A). Il a été montré par hybridation, dans l'exemple 5.2, que le fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb, contient le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase de *S. pristinaespiralis* SP92. Le plasmide pVRC402
25 contient donc le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase de *S. pristinaespiralis* SP92.
30

6. 2. Isolement d'un fragment BglII-BglII de 4.6 kb à partir du cosmide pIBV2.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV2, il est possible de sous cloner un fragment d'ADN de taille inférieure, dans le but d'identifier dans les régions adjacentes au gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase, la présence d'autres gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines I.

5 Les différentes étapes de clonage ont été réalisées comme décrit plus haut.

Environ 10 µg du cosmide pIBV2 ont été coupés par BglII. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et le fragment BglII-BglII de 4.6 kb a été isolé par électroélution.

10 Environ 100 ng de pUC19 coupés par BamHI ont été ligaturés avec 200 ng du fragment BglII-BglII.

Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1 comme décrit dans l'exemple 6.1. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC501. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 8(B).

15 6.3. Isolement du fragment BamHI-BamHI de 6 kb contenant les gènes de structure des deux sous-unités de la Pristinamycine IIA-synthase.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV1, il est possible de sous cloner un fragment d'ADN de taille inférieure, contenant les gènes de structure des deux sous-unités de la Pristinamycine IIA-synthase.

Les différentes étapes de clonage ont été réalisées comme décrit plus haut.

20 Environ 10 µg du cosmide pIBV1 ont été coupés par BamHI. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et le fragment BamHI de 6 kb a été isolé par électroélution.

Environ 100 ng de pBKS⁻ (Stratagene Cloning Systems, La Jolla Californie) coupés par BamHI, ont été ligaturés avec 200 ng du fragment BamHI de 6 kb.

25 Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1. Le plasmide recombinant a été nommé pXL2045. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 9. Il a été montré par hybridation, dans l'exemple 5.1, que le fragment BamHI de 6 kb, contient les gènes snaA et snaB, codant pour les deux sous unités de la Pristinamycine IIA-synthase de S. pristinaespiralis SP92. Le
30 plasmide pXL2045 contient donc les gènes snaA et snaB, codant pour les deux sous unités de la Pristinamycine IIA-synthase de S. pristinaespiralis SP92.

EXEMPLE 7 : Séquence des fragments d'ADN isolés contenant les gènes de biosynthèse des Pristinamycines de S. pristinaespiralis SP92

Cet exemple illustre le séquençage de fragments d'ADN portant d'une part des gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines de la famille des Pristinamycines I et d'autre part des gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines de la famille des Pristinamycines II de la souche *S. pristinaespiralis*.

5 7.1. Séquençage d'un fragment BamHI-XhoI de 5 kb

Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique d'un fragment contenant les gènes *snaA* et *snaB* de *S. pristinaespiralis* SP92 peut être obtenue.

Le fragment BamHI-XhoI fait partie du fragment BamHI-BamHI de 6 kb qui a été cloné dans le phasme pBKS- pour donner le plasmide pXL2045 décrit dans l'exemple 6. Des sous-fragments de cet insert BamHI-XhoI de 5 kb ont ensuite été obtenus par digestion enzymatique puis sous-clonés dans les phages M13mp18 ou M13mp19 (Messing *et al*, 1981) dans les deux orientations. Les sites de sous-clonage utilisés sont les suivants : EcoRI, PstI, PstI, NruI, EcoRI, NruI, NotI, SalI, SstI, XhoI, SalI et XhoI et sont représentés sur la figure 9.

15 Ces différents inserts ont été séquencés par la méthode de réaction de terminaison de chaîne en utilisant comme amorce de synthèse le primer universel (Maniatis *et al*, 1989) ou des oligonucléotides synthétisés (comme il est décrit dans l'exemple 5), et complémentaires d'une séquence de 20 nucléotides de l'insert à séquencer.

20 Le recouvrement entre ces différents inserts a permis d'établir la séquence nucléotidique totale sur les deux brins du fragment BamHI-XhoI qui comprend 5392 pb (SEQ ID n° 1).

7. 2. Séquençage d'une région de 1870 bp du fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb

25 Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique d'un fragment contenant le gène *snbA* de *S. pristinaespiralis* SP92 peut être obtenue.

La région de 1870 pb séquencée fait partie du fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb qui a été cloné dans le plasmide pUC19 pour donner le plasmide pVRC402 décrit dans l'exemple 6 (figure 8(A)). Des sous-fragments de l'insert EcoRI-BglII de 5.5 kb ont été obtenus par coupure enzymatique puis sous-clonés dans des phages M13mp18 ou M13mp19 dans les deux orientations. Les sites de sous-clonage sont HindIII, PstI et HindIII et sont représentés sur la figure 8(A).

Le recouvrement entre ces fragments a permis d'établir la séquence totale de la région Sau3A-Sau3A qui comprend 1870 pb (SEQ ID n° 8).

7.3. Séquence d'une région de 1830 pb dans le fragment BamHI-EcoRI de 3.1 kb

5 Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique d'un fragment adjacent à celui qui contient le gène snbA de S. pristinaespiralis SP92 peut être obtenue.

Cette séquence a été réalisée par sous-clonage des fragments BamHI-PstI de 1 kb et PstI-EcoRI de 2,1 kb (figure 8(B)) à partir du pVRC501 (Exemple 6) dans les vecteurs M13mp18 et M13mp19. Le site PstI a été traversé par sous-clonage d'un
10 fragment Sau3A-Sau3A de 423 pb chevauchant ce site, puis séquençage. La séquence de 1830 pb ainsi obtenue est représentée sur la (SEQ ID n° 10).

EXEMPLE 8: Analyse des séquences nucléotidiques par détermination des phases ouvertes

Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes
15 de lecture présentes dans les séquences nucléotidiques définies à l'exemple 7, et d'identifier des gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines I et des Pristinamycines II de S. pristinaespiralis SP92 ainsi que les polypeptides codés par ces gènes.

8.1. Fragment BamHI-XhoI de 5 kb (pXL2045).

20 Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein du fragment BamHI-XhoI de 5 kb précédemment isolé et séquencé comme il est décrit dans les exemples 6 et 7.

Nous avons recherché la présence de phases ouvertes de lecture au sein du fragment BamHI-XhoI de 5 kb en utilisant le fait que l'ADN des Streptomyces
25 présente un haut pourcentage en bases G et C ainsi qu'un fort biais dans l'usage des codons qui composent les phases codantes (Bibb *et al.*, 1984). La méthode de Staden et McLachlan (1982) permet de calculer la probabilité des phases codantes en fonction de l'usage des codons de gènes de Streptomyces déjà séquencés et rassemblés dans un fichier contenant 19673 codons obtenu à partir du serveur informatique
30 BISANCE (Dessen *et al.*, 1990).

Cette méthode a permis de caractériser au sein du fragment BamHI-XhoI de 5 kb, quatre phases ouvertes de lecture fortement probables qui sont représentées dans le tableau suivant. Elles sont nommées phases 1 à 4 d'après leur position à partir du site BamHI. Pour chacune, on a indiqué leur longueur en bases, leur position au sein du fragment (le site BamHI étant situé à la position 1) ainsi que le poids moléculaire en kDa de la protéine correspondante. Les phases 1, 3 et 4 sont codées par le même brin et la phase 2 par le brin complémentaire (figure 9).

Numéro de la phase et nom du gène	Position	nombre de nucléotides	nombre d'acides aminés	PM en kDa de la protéine codée
1 (<u>snaA</u>)	48-1313	1266	422	46.5
2	2530-1328 (inv)	1203	401	-
3 (<u>snaB</u>)	2692-3522	831	277	29
4 (<u>snaC</u>)	3558-4763	1206	402	43

- Les phases 1 et 3 correspondent respectivement aux protéines SnaA (SEQ ID n° 2 et 3) et SnaB (SEQ ID n° 4 et 5) précédemment isolées comme il est décrit dans l'exemple 5 et dont le clonage des gènes est détaillé dans l'exemple 6. En effet les séquences NH₂-terminales des produits des ORFs 1 et 3 sont identiques aux séquences NH₂-terminales trouvées pour les protéines SnaA et SnaB respectivement, à l'exemple 5.1.2, sauf pour la méthionine amino-terminale qui a été excisée. Par ailleurs, les masses moléculaires calculées d'après les séquences sont comparables aux masses moléculaires apparentes des protéines SnaA et SnaB, estimées respectivement en PAGE-SDS comme il est décrit dans l'exemple 5.

- La comparaison du produit de la phase ouverte n°4 avec les séquences protéiques contenues dans la banque Genpro fait apparaître une homologie avec différentes S-adenosylmethionine (ou SAM) synthases codées par d'autres organismes. Les pourcentages d'homologie calculés sur la totalité de la séquence à l'aide de l'algorithme de Kanehisa (1984) varient de 51,8 à 55,4 %.

Ces comparaisons de séquence permettent donc de mettre en évidence que le produit de la phase ouverte n°4 est une SAM synthase, impliquée dans la biosynthèse des Pristinamycines II (et peut-être Pristinamycines I). Ce gène a été désigné snaC (SEQ ID n° 6 et 7).

5 La mise en évidence de l'implication d'une SAM synthase dans la biosynthèse des Streptogramines est confirmée par les données biochimiques décrites pour la Virginiamicine M1 (une Streptogramine appartenant au même groupe A que les Pristinamycines II) qui indiquent que le groupement méthyl C-33 provient
10 du cycle macrolactone avec une molécule de SAM (Kingston *et al.* 1983).

- La comparaison de la séquence du produit de la phase ouverte n°2 avec les séquences protéiques contenues dans la banque Genpro, fait apparaître qu'une partie interne de cette protéine est homologue à 36% avec une partie interne de la première phase ouverte de la séquence d'insertion (IS891) d'Anabaena (Bancroft et Wolk,
15 1989). Ce résultat suggère que la phase ouverte n°2, désignée orf 401, appartient à une séquence d'insertion, et donc qu'il existe une séquence d'insertion située entre les gènes snaA et snaB.

8. 2. Fragment Sau3A-Sau3A de 1870 pb (pVRC402)

Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes
20 de lecture présentes au sein du fragment Sau3A-Sau3A de 1870 pb précédemment isolé et séquencé comme il est décrit dans les exemples 6 et 7.

La recherche de phases ouvertes pour le fragment Sau3A-Sau3A a été effectuée comme précédemment. Une seule phase ouverte de lecture complète a pu ainsi être mise en évidence. Ses caractéristiques sont les suivantes: cette phase s'étend de la
25 position 109 à la position 1858 du fragment Sau3A-Sau3A, ce qui correspond à une phase de 1749 bases codant pour une protéine de 582 acides aminés ayant une masse moléculaire de 61.4 kDa. Cette protéine correspond à la protéine SnaA précédemment purifiée comme il est décrit dans l'exemple 5 et dont le clonage du gène est détaillé dans l'exemple 6. En effet la séquence NH₂-terminale du produit de
30 l'ORF présente sur le fragment Sau3A-Sau3A est identique à la séquence NH₂-terminale trouvée pour la protéine SnaA, à l'exemple 5.2. La masse moléculaire de 61.4 kDa calculée d'après la séquence est comparable à la masse moléculaire apparente de la protéine SnaA, estimée à 67 kDa en PAGE-SDS et à 600 kDa par perméation sur gel comme il est décrit dans l'exemple 5.2.1B.

Le gène snbA code donc pour l'enzyme qui catalyse la formation de l'acyladenylate 3-hydroxypicolinyl-AMP à partir d'une molécule d'acide 3-hydroxypicolinique et d'une molécule d'ATP : l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase (SEQ ID n° 8 et 9).

5 8.3. Fragment BamHI-EcoRI de 3,1 kb (pVRC501).

Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein du fragment BamHI-EcoRI de 3,1 kb précédemment isolé et séquencé comme il est décrit dans les exemples 6 et 7.

La recherche de phases ouvertes pour le fragment BamHI-EcoRI de 3,1 kb a été effectuée comme précédemment. Une seule phase ouverte de lecture complète a pu ainsi être mise en évidence. Ses caractéristiques sont les suivantes: le démarrage probable de cette phase se situe à la position 103 et la fin à la position 1686 de la région de 1830 pb séquencée à partir du fragment BamHI-EcoRI, ce qui correspond à une protéine de 528 acides aminés ayant un poids moléculaire approximatif de 54 kDa.

La comparaison de la séquence de cette protéine avec les séquences contenues dans la banque Genepro fait apparaître qu'elle est homologue à des protéines ayant une fonction de transport pour différents métabolites, notamment pour la tétracycline chez différents microorganismes (Khan et Novick, 1983; Hoshino et al., 1985), l'actinorhodine (Fernandez-Moreno et al., 1991) et la méthylénomycine (Neal et Chater, 1987b) chez S. coelicolor.

Ces données indiquent que le produit de la phase ouverte contenue dans le fragment BamHI-EcoRI de 3,1 kb est une protéine de transport permettant d'exporter les Pristinamycines I (et éventuellement Pristinamycines II) à l'extérieur de la cellule. Cette protéine a été désignée SnbR et le gène correspondant snbR (SEQ ID n° 10 et 11).

L'analyse du profil d'hydrophobicité de la protéine SnbR par la méthode de Kyte et Doolittle (1982) corrobore sa localisation membranaire et donc sa fonction de transport.

30 L'étude des fragments d'ADN de la souche S. pristinaespiralis SP92, portés par les cosmides pIBV1 et pIBV2, a mis en évidence la présence de plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines II et des Pristinamycines I. Les gènes snaA, snaB et snaC codent pour des enzymes intervenant dans la biosynthèse

des Pristinamycines II, la Pristinamycine IIA-synthase et une probable SAM synthase et sont groupés physiquement sur un large fragment d'ADN cloné dans le cosmide pIBV1. De même les gènes snbA et snbR qui codent pour des protéines intervenant dans la biosynthèse des Pristinamycines I, l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase et une protéine probablement responsable du transport des Pristinamycines I, sont groupés sur un large fragment d'ADN cloné dans le cosmide pIBV2. Ces résultats confirment l'hypothèse du groupement des gènes de biosynthèse des Pristinamycines II et également des gènes de biosynthèse des Pristinamycines I et offrent la possibilité de cloner les autres gènes impliqués dans ces biosynthèses, par marche sur le chromosome, en amont et en aval des régions étudiées.

De plus, il est possible par hybridation de l'ADN total des différentes souches productrices de Streptogramines (cf tableau 1) avec les gènes snaA, snaB, snaC, snbA, snbR, ou avec les gènes identifiés par marche sur le chromosome, ou avec des fragments de ceux-ci, d'isoler les gènes correspondants aux mêmes fonctions dans les autres microorganismes producteurs de Streptogramines. Ceci permet par la même démarche que celle envisagée pour les Pristinamycines, d'isoler l'ensemble des gènes impliqués dans la biosynthèse des différentes Streptogramines.

EXEMPLE 9 : Etude génétique de fragments d'ADN par disruption de gènes.

Cet exemple illustre comment il est possible de mettre en évidence l'implication de gènes dans la biosynthèse des Streptogramines en construisant des souches dérivées d'une souche productrice, mutées au niveau de ces gènes par disruption et en analysant le phénotype de tels mutants. Cet exemple montre de plus comment obtenir des souches ne produisant plus que l'un ou l'autre des composants A et B des Streptogramines.

9.1 Construction d'un mutant de *S.pristinaespiralis* SP92 disrupté dans le gène snaA.

Cet exemple illustre comment il est possible par disruption du gène snaA, de construire une souche de *S.pristinaespiralis* SP92 qui ne produit plus de Pristinamycine IIA et qui produit par contre de la Pristinamycine IIB.

Ce mutant a été construit dans le but de confirmer la fonctionnalité de la protéine SnaA et de fournir un intermédiaire de production de la Pristinamycine II, pouvant par la suite être modifié.

Sa construction a été réalisée à l'aide d'un vecteur suicide, capable de se répliquer chez *E.coli* seulement, mais portant un marqueur de résistance s'exprimant chez *Streptomyces*. Ce vecteur, pDH5, a été développé par Hillemann *et al.* (1991).

9.1.1 Construction du plasmide pVRC505 :

5 Cet exemple illustre comment il est possible de construire un plasmide ne se répliquant pas chez *S.pristinaespiralis* SP92 et qui peut être utilisé pour disrupter par simple recombinaison homologue le gène *snaA*.

Le plasmide pVRC505 a été construit pour réaliser le mutant chromosomique SP92 disrupté dans le gène *snaA* à partir du plasmide pXL2045 décrit dans l'exemple 6.3.

10 Le fragment *Bam*HI de 6 kb, cloné dans le pXL2045 (figure 9), a été coupé par les enzymes de restriction *Eco*RI et *Pst*I. Après séparation des fragments ainsi générés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %, un fragment de 0.7 kb, contenant l'extrémité 5' du gène *snaA*, a été isolé et purifié par GeneClean (Bio101, La Jolla, 15 Californie).

100 ng de vecteur pDH5 linéarisé par une double digestion *Eco*RI, *Pst*I, ont été ligués avec 100 ng du fragment de 0.7 kb, comme décrit dans l'exemple 3.3. Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC505. Le plasmide pVRC505 a été préparé 20 comme décrit dans l'exemple 2.1. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 10.

9.1.2. Isolement du mutant SP92 disrupté dans le gène *snaA* par recombinaison homologue.

25 Cet exemple illustre comment le mutant de *S.pristinaespiralis* SP92, disrupté dans le gène *snaA*, a été construit.

Ce mutant a été isolé par transformation de la souche SP92 avec le plasmide suicide pVRC505.

La préparation des protoplastes et leur transformation ont été réalisées comme décrit dans D. Hopwood *et al.* (1985).

30 La souche SP92 a été cultivée en milieu YEME, 34% de sucrose, 5 mM MgCl₂, glycine 0.25 % pendant 40 hrs à 30°C. Le mycélium a été protoplastisé en présence

de lysozyme et 5X1 µg de pVRC505 ont été utilisés pour la transformation (par la méthode utilisant le PEG) des protoplastes. Après une nuit de régénération des protoplastes sur milieu R2YE (D. Hopwood *et al.* 1985), les recombinants ont été sélectionnés par étalement de 3 ml de milieu SNA (D. Hopwood *et al.* 1985) contenant 2.6 mg/ml de thiostrepton.

Sur les 5 transformations réalisées, 3 clones résistants au thiostrepton ont été isolés. Ceci donne un taux de recombinants inférieur à 1 par mg d'ADN. Ces recombinants résultent de l'intégration par simple recombinaison homologue entre le gène snaA porté par le chromosome de la souche SP92 et le fragment de 0.7 kb du plasmide suicide pVRC505. La faible taille du fragment inséré dans pVRC505, 0.7 kb, explique le faible taux de recombinaison.

Les spores des recombinants ont été isolées par étalement et croissance sur milieu R2YE supplémenté par 400 µg/ml de thiostrepton, et réétalées sur le même milieu pour obtenir des colonies isolées.

Afin de vérifier la position de l'intégration du plasmide pVRC505, différents Southern de l'ADN total de plusieurs clones recombinants digéré par les enzymes de restriction appropriées, ont été réalisés et hybridés avec le vecteur pDH5 et le fragment de 0.7 kb, utilisés successivement comme sondes après marquage par random priming (Random Primed DNA labeling kit, Boehringer Mannheim, France) avec du dCTP αP³², comme décrit dans Maniatis *et al.* (1989). Les résultats d'hybridation montrent l'apparition, dans le génome des clones recombinants, d'une bande EcoRI-PstI supplémentaire, de la taille du vecteur pDH5 et hybridant avec celui-ci ainsi que d'une bande supplémentaire EcoRI-EcoRI, hybridant à la fois avec les 2 sondes. Un de ces mutants a été nommé SP92::pVRC505. Ce mutant correspond bien à l'intégration par simple recombinaison homologue du plasmide pVRC505 dans le gène snaA.

9.1.3 Production de Pristinamycines par le mutant SP92::pVRC505.

Cet exemple illustre comment il est déterminé que le mutant de S.pristinaespiralis SP92 disrupté dans le gène snaA par l'intégration du plasmide pVRC505, ne produit plus de Pristinamycine IIA, tout en continuant à produire de la Pristinamycine IIB.

Le mutant SP92::pVRC505, ainsi que la souche SP92, en tant que souche témoin, ont été cultivés en milieu de production liquide. La fermentation a été réalisée

comme suit : 0.5 ml d'une suspension de spores des souches citées sont ajoutés en conditions stériles à 40 ml de milieu inoculum dans un erlen de 300 ml. Le milieu inoculum est constitué par 10 g/l de Corn Steep, 15 g/l de saccharose, 10 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l de K_2HPO_4 , 3 g/l de NaCl , 0.2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 1.25 g/l de CaCO_3 . Le pH est ajusté à 6.9 par de la soude avant l'introduction du carbonate de calcium. Les erlens sont agités pendant 44 hrs à 27°C sur un agitateur rotatif à la vitesse de 325 tr/mn. 2.5 ml de la culture précédente âgée de 44 hrs sont ajoutés stérilement à 30 ml de milieu de production dans un erlen de 300 ml. Le milieu de production est constitué par 25 g/l de farine de soja, 7.5 g/l d'amidon, 22.5 g/l de glucose, 3.5 g/l de levure fourragère, 0.5 g/l de sulfate de zinc et 6 g/l de carbonate de calcium. Le pH est ajusté à 6 par de l'acide chlorhydrique avant l'introduction du carbonate de calcium. Les erlens sont agités pendant 24, 28 et 32 hrs à 27°C. A chaque temps, 10 g de moût sont pesés dans un erlen lisse, auxquels sont ajoutés 20 ml de phase mobile composée par 62.5 % d'acétonitrile et 37.5 % d'une solution de 0.1 M de KH_2PO_4 (ajusté à pH3 par H_3PO_4). Après agitation sur un agitateur (325 rpm) pendant 20 mn à température ambiante, le tout est filtré sur filtre de papier et les Pristinamycines sont dosées par CLHP comme décrit à l'exemple 5.1.1A.

Les résultats ont montré que, dans les conditions de fermentation réalisées, le mutant SP92::pVRC505 a produit une quantité de Pristinamycine I équivalente à celle du témoin SP92, ceci pour les 3 temps testés. En revanche, alors que le témoin a produit à 24, 28 et 32 hrs de fermentation, environ 70 % de Pristinamycine IIA et 30 % de Pristinamycine IIB, le mutant SP92 :: pVRC505 a produit pour ces mêmes temps, 100 % de Pristinamycine IIB, en quantité équivalente à la somme des Pristinamycine IIA + Pristinamycine IIB produites par la souche SP92. Le mutant est donc bien bloqué dans une étape de biosynthèse de la Pristinamycine II qui correspond à l'oxydation de la liaison 2-3 de la D-proline de l'intermédiaire Pristinamycine IIB. Ce mutant accumule donc la Pristinamycine IIB. Ceci montre bien l'implication fonctionnelle de SnaA dans la conversion Pristinamycine IIB en Pristinamycine IIA.

Cet exemple montre qu'il est possible, à partir des gènes de biosynthèse clonés, de construire des souches mutées dans les étapes de biosynthèse des Pristinamycines. Ceci a été montré pour les Pristinamycines II mais les mêmes résultats peuvent être obtenus pour les Pristinamycines I et par extension, pour les différents composants des Streptogramines. Des souches produisant différents intermédiaires peuvent être

ainsi obtenues. Ces souches peuvent être utilisées pour produire des molécules nouvelles, par modification(s) chimique, biochimique, enzymatique, etc desdits intermédiaires. Un blocage dans une étape précoce de la voie de biosynthèse de l'un ou l'autre des composants des Streptogramines peut également conduire à des souches mutées ne produisant plus que l'un ou l'autre des composants.

EXEMPLE 10 : Complémentation d'un mutant non producteur de la souche SP92.

Cet exemple montre comment il est possible d'exprimer des gènes de biosynthèse des Pristinamycines. Cette expression a été plus particulièrement réalisée pour les gènes snaA et snaB portés par le cosmide pIBV1, dans une souche mutante dérivée de SP92 : SP120. Ce mutant ne produit pas de Pristinamycine IIA. Il accumule le dernier intermédiaire de la voie de biosynthèse de la Pristinamycine II : Pristinamycine IIB.

10.1 Clonage des gènes snaA et snaB dans le vecteur navette pIJ903.

Cet exemple illustre comment un sous-fragment du cosmide pIBV1, contenant les gènes snaA et snaB, a été cloné dans un vecteur capable de se répliquer à la fois chez E. coli et chez Streptomyces.

Le vecteur pIJ903 (Lydiat D. J. *et al.*, 1985) est un vecteur navette à faible nombre de copies (1 à 3 par cellule), capable de se répliquer à la fois chez E.coli grâce à son origine de répllication de pBR322 et chez Streptomyces grâce à son origine de répllication de SCP2*. Le gène de résistance à l'ampicilline permet la sélection dans E.coli et le gène de résistance au thiostrepton permet la sélection dans Streptomyces.

Le cosmide pIBV1 a été digéré par l'enzyme de restriction SstI. Un large fragment d'ADN de 7.6 kb portant les gènes snaA et snaB a été isolé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et électroélué. 500 ng de ce fragment ont été ligaturés avec 100 ng du vecteur pUC1813 (Kay et McPherson, 1987) linéarisé par SstI. Après transformation de la souche E.coli DH5 α (supE44 Δ lacU169 (f80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1; Hanahan, 1983) et sélection des transformants sur LB solide contenant 150 μ g/ml d'ampicilline et 20 μ g/ml de X-gal, un clone portant le fragment de 7.6 kb a été isolé. Le plasmide a été

nommé pVRC506. Une préparation de ce plasmide recombinant a été réalisée comme décrit dans l'exemple 2.1.

Le clonage dans le vecteur pIJ903 a été réalisé au site HindIII. Le plasmide pVRC506 a été coupé par HindIII et le fragment de 7.6 kb portant les gènes snaA et snaB a été isolé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et électroélué. 500 ng de ce fragment ont été ligaturés avec 500 ng du vecteur pIJ903 linéarisé par HindIII. Après transformation de la souche E.coli DH5 α et sélection des transformants sur LB solide contenant 150 μ g/ml d'ampicilline, un clone portant le fragment de 7.6 kb a été isolé. Le plasmide a été nommé pVRC507. Une préparation de ce plasmide recombinant a été réalisé comme décrit dans l'exemple 2.1. Sa cartographie est présentée figure 11.

10.2 : Expression des gènes snaA et snaB dans le mutant SP120

Cet exemple illustre comment il est possible d'exprimer les protéines SnaA et SnaB chez S.pristinaespiralis SP92, par introduction dans cette souche, d'un plasmide portant les gènes de structure correspondants.

L'expression des gènes snaA et snaB a été réalisée après transformation de la souche mutante SP120 avec 500 ng de plasmide pVRC507. La transformation des protoplastes de SP120 et la sélection des transformants au thiostrepton a été réalisée comme décrit dans l'exemple 9.1.2.

De nombreux transformants ont été ainsi obtenus et 3 d'entre eux ont été choisis pour les tests de production en milieu liquide. La souche SP120 portant le plasmide pIJ903 a été choisie comme témoin. Les fermentations ainsi que l'extraction des produits de biosynthèse ont été réalisés comme décrit en l'exemple 9.1.3.

Les résultats ont montré que dans les conditions de fermentation réalisées, alors que le témoin (SP120 portant le plasmide pIJ903) a produit à 24, 28 et 32 hrs de fermentation, 100 % de Pristinamycine IIB et 0 % de Pristinamycine IIA, les 3 clones de la souche SP120 transformés par le plasmide pVRC507, ont produit pour ces mêmes temps, environ 85 à 80 % de Pristinamycine IIB et 15 à 20 % de Pristinamycine IIA, dont la somme est équivalente en quantité à la production de Pristinamycine IIB de la souche témoin (SP120 portant le plasmide pIJ903). Les clones portant pVRC507 ont bien été complémentés pour l'étape de biosynthèse des Pristinamycines II correspondant à l'oxydation de la liaison 2-3 de la D-proline de l'intermédiaire Pristinamycine IIB. Ceci a été confirmé par dosage enzymatique de l'activité Pristinamycine IIA-synthase, comme décrit dans l'exemple 5.1.1.A., pour les

souches SP120 portant pVRC507 et SP120 portant pIJ903. Alors que la souche témoin SP120 portant pIJ903, ne présente aucune activité Pristinamycine IIA-synthase, la souche SP120 portant pVRC507, présente une activité Pristinamycine IIA-synthase.

- 5 Cet exemple montre qu'il est possible d'exprimer des gènes de biosynthèse des Streptogramines. Cette expression a été étudiée plus particulièrement pour les gènes codant pour la Pristinamycine IIA-synthase mais les autres gènes de biosynthèse des Pristinamycines II et des Pristinamycines I et ainsi que ceux impliqués dans la biosynthèse des composants des différentes Streptogramines peuvent être ainsi
- 10 exprimés. Cette expression peut être réalisée dans des souches mutantes comme c'est le cas dans l'exemple 10, mais également dans des souches productrices afin d'augmenter les niveaux de production des Streptogramines. L'expression peut être modifiée par clonage des gènes dans un vecteur à nombre de copies différent (faible ou élevé) ou dans un vecteur intégratif, par dérégulation de ces gènes, par clonage de
- 15 ces gènes sous un promoteur homologue ou hétérologue (promoteur fort ou régulé spécifiquement). L'expression des différents gènes de biosynthèse des Streptogramines peut également être réalisée dans des souches hétérologues à partir de vecteurs d'expression adaptés, afin de produire des antibiotiques hybrides.

TABLEAU 1

MICROORGANISMES	ANTIBIOTIQUES
<p>CHAMPIGNONS</p> <p><u>Micromonospora</u> sp.</p> <p>STREPTOMYCES</p> <p><u>S. alborectus</u></p> <p><u>S. conganensis</u> (ATCC13528)</p> <p><u>S. diastaticus</u></p> <p><u>S. graminofasciens</u></p> <p><u>S. griseus</u> (NRRL2426)</p> <p><u>S. griseoviridus</u></p> <p><u>S. griseoviridus</u> (FERMP3562)</p> <p><u>S. lavendulae</u></p> <p><u>S. loïdensis</u> (ATCC11415)</p> <p><u>S. mitakaensis</u> (ATCC15297)</p> <p><u>S. olivaceus</u> (ATCC12019)</p> <p><u>S. ostréogriseus</u> (ATCC27455)</p> <p><u>S. pristinaespiralis</u> (ATCC25486)</p> <p><u>S. virginiae</u> (ATCC13161)</p> <p>ACTINOMYCETES</p> <p><u>A. auranticolor</u>(ATCC31011)</p> <p><u>A. azureus</u> (ATCC31157)</p> <p><u>A. daghestanicus</u></p> <p><u>A. philippinensis</u></p> <p><u>Actinoplanes</u> sp. (ATCC33002)</p> <p><u>Actinoplanes</u> sp.</p> <p><u>Actinomadura flava</u></p>	<p>Vernamycines</p> <p>Virginiamycines</p> <p>F1370 A, B</p> <p>Plauracines, Streptogramines</p> <p>Streptogramines</p> <p>Viridogriséine (Etamycine)</p> <p>Griseoviridine</p> <p>Néoviridogriséines</p> <p>Etamycines</p> <p>Vernamycines</p> <p>Mikamycines</p> <p>Synergistines (PA114 A, B)</p> <p>Ostréogrycines</p> <p>Pristinamycines</p> <p>Virginiamycines (Staphylomycines)</p> <p>Plauracines</p> <p>Plauracines</p> <p>Etamycine</p> <p>A-2315 A, B, C</p> <p>A15104</p> <p>A17002 A, B, C, F</p> <p>Madumycines</p>

Abreviations utilisées :

	ADN :	acide déoxyribonucléique
	AMP :	adénosine 5'-monophosphate
	ATP :	adénosine 5'-triphosphate
5	BET :	bromure d'éthidium
	BSA :	bovine serum albumine
	CLHP :	chromatographie liquide haute performance
	DO :	Densité optique
	DTE :	dithioerythritol
10	DTT :	dithiothréitol
	EDTA :	acide éthylènediaminetétraacétique
	FMN :	flavine mononucleotide
	FMNH ₂ :	flavine mononucleotide reduite
	kDa:	kilodalton
15	kb:	kilobase
	LB:	Luria broth (milieu de croissance riche pour <u>E. coli</u>)
	NAD :	nicotinamide dinucleotide
	NADH :	nicotinamide dinucleotide réduit
	PAGE :	electrophorese sur gel polyacrylamide
20	pb :	paire de base
	PMSF :	phenylmethylsulfonyl fluoride
	PPi :	pyrophosphate
	SAM:	S-adénosylméthionine
	SDS :	sodium dodecyl sulfate
25	TE :	tris-EDTA
	Tris:	amino-2-hydroxylméthyl-2 propanediol-1,3
	U.V.:	rayons ultra-violets
	Xgal:	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-b-D-galactoside
	YEME:	yeast extract-malt extract medium (milieu de croissance riche pour
30		<u>Streptomyces</u>)

Bibliographie:

- Anzai H., Murakami T., Imai A., Satoh A., Nagaoka K. et Thompson C. J. (1987) *J. Bacteriol.*, **169** : 3482-3488.
- Bancroft I. et WolK C. P. (1989) *J. Bacteriol.*, **171** : 5949-5954.
- Bibb M. J., Findlay P. R. et Johnson M. W. (1984) *Gene*, **30** : 157-166.
- Birnboim H. C. et Doly J. (1979) *Nucleic Acids Res.*, **7** : 1513-1523.
- Blattner F. R., Williams B. G., Blechl A. E., Denniston-Thompson K., Faber H. E., Furlong L. A., Grunwald D. J., Kiefer D. O., Moore D.D., Schumm J.W., Sheldon E. L. et Smithies O. (1977) *Science*, **196** : 161-169.
- Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heynecker H. L., Boyer H. W., Crosa J. H. et Falkow S. (1977) *Gene*, **2** : 95-113.
- Boyer H. W. et Roulland-Dussoix D. (1969) *J. Mol. Biol.*, **41** : 459.
- Chater K. F. (1990) *Bio/Technology*, **8** : 115-121.
- Cocito C. G. (1979) *Microbiol. Rev.*, **43** : 145-198.
- Cocito C. G. (1983) *In Antibiotics*, **6** : (Ed. F. E. Hahn), 296-332.
- Dessen P. C., Fondrat C., Valencien C. et Mugnier C. (1990) *Comp. Appl. in Biosciences*, **6** : 355-356.
- Di Giambattista M., Chinali G. et Cocito C. G. (1989) *J. Antim. Chemother.*, **24** : 485-507.
- Fernandez-Moreno M. A., Caballero J. L., Hopwood D. A. et Malpartida F. (1991) *Cell*, **66** : 769-780.
- Gibson T. J. (1984) *Ph.D. thesis*, Cambridge University, England.
- Hallam S. E., Malpartida F. et Hopwood D. A. (1988) *Gene*, **74** : 305-320.
- Hames B. D. et Higgins S. J. (1985) *IRL Press Ltd., Oxford, U. K.*,
- Hanahan D. (1983) *J. Mol. Biol.*, **166** : 557
- Hillemann D., Pülher A. et Wohlleben W. (1991) *Nucl. Acids Res.*, **19** : 727-731.
- Hohn B. et Collins J. F. (1980) *Gene*, **11** : 291-298.
- Hook J. D. et Vining L. C. (1973) *J.C.S. Chem. Comm.*, 185-186.
- Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J., Kieser H. M., Lydiate D. J., Smith C. P., Ward J. M. et Scrempf H. (1985) *A laboratory manual*, The John Innes Fondation, Norwich, England.
- Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Janssen G. R., Malpartida F. et Smith C. (1986b) *In Regulation of gene expression - 25 years on (ed. I; A. Booth C; F. Higgins)*, 251-276.
- Hopwood D. A., Malpartida F., Kieser H. M., Ikeda H., Duncan J., Fujii I., Rudd A. M., Floss H. G. et Omura S. (1985a) *Nature*, **314** : 642-644.
- Hopwood D. A., Malpartida F., Kieser H. M., Ikeda H. et Omura S. (1985b) *In Microbiology (ed S. Silver). American Society for Microbiology, Washington D. C.*, 409-413.
- Hopwood D. A., Malpartida F. et Chater K. F. (1986a) *In Regulation of secondary metabolite formation. (eds. H. Kleinkauf, H. von Hohren, H. Dornauer G. Nesemann)*, 22-33.
- Hoshino T., Ikeda T., Tomizuka N. et Furukawa K. (1985) *Gene*, **37** : 131-138.

- Hutchinson C. R., Borell C. W., Otten S. L., Stutzman-Engwall K. J. et Wang Y. (1989) *J. Med. Chem.*, 32 : 929-937.
- Ish-Horowitz D. et Burk J. F. (1981) *Nucleic Acids Res.*, 9 : 2989-298.
- Kanehisa M. I. (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12 : 203-215.
- Kay R. et McPherson J. (1987) *Nucleic Acids Res.*, 15 (6) : 2778.
- Khan S. A. et Novick R. (1983) *Plasmid*, 10 : 251-259.
- Kingston D. G. I., Kolpak M. X., Lefevre W. et Borup-Grochtmann I. B. (1983) *J. Am. Chem. Soc.*, 105 : 5106-5110.
- Kyte J. et Doolittle R. (1982) *J. Biol. Mol.*, 157 : 105-135.
- Low B. (1968) *Proc. Nalt. Acad. Sci.*, 60 : 160.
- Lydiate D. J., Malpartida F. et Hopwood D. A. (1985) *Gene*, 35 : 223-235.
- Maniatis T., Fritsh E. F. et Sambrook J. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, N. Y.*,
- Meinkoth J. et Wahl G. (1984) *Anal. Biochem.*, 138 : 267-284.
- Messing J., Crea R. et Seeburg P. H. (1981) *Nucleic Acids Res.*, 9 : 309.
- Neal R. J. et Chater K. F. (1987) *Gene*, 58 : 229-241.
- Ohnuki T., Imanaka T. et Aiba S. (1985) *J. Bacteriol.*, 164 : 85-94.
- Rusnak F., Sakaitani M., Drueckhammer D., Reichert J. et Walsh C. T. (1991) *Biochemistry*, 30 : 2916-2927.
- Sawadogo M. et Van Dyke M. W. (1991) *Nucl. Acids Res.*, 19 : 674.
- Staad J. F., Elkins M. F. et Earhart C. F. (1989) *FEMS Microbial. Lett.*, 59 : 15-20.
- Staden R. et McLachlan A. D. (1982) *Nucleic Acids Res.*, 10 : 141-156.
- Videau D. (1982) *Path. Biol.*, 30 : 529-534.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
- (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
- (C) VILLE: ANTONY
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 92165

(ii) TITRE DE L' INVENTION: POLYPEPTIDES IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES STREPTOGRAMINES, SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR CES POLYPEPTIDES ET UTILISATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 11

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5392 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucl,ique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

```

GGATCCTGGC GTCCGCCGTC AAGAACTGAA CCGAGGAGAC ACCCACCATG ACCGCACCCC      60
GCCGGCGCAT CACCCCTCGCC GGCATCATCG ACGGCCCCGG CGGCCATGTG GCCGCCTGGC      120
GCCACCCGGC GACCAAGGCG GACGCCCAGC TCGACTTCGA ATTCCACCGC GACAACGCCC      180
GCACCCTCGA ACGCGGCCTG TTCGACGCCG TGTTCATCGC GGACATCGTC GCCGTGTGGG      240
GCACCCGCCT GGACTCCCTG TGCCGCACCT CGCGCACC GA CACTTCGAA CCGCTCACCC      300
TGCTCGCCGC CTACGCCGCG GTCACCGAGC ACATCGGCCT GTGCGCCACC GCCACCACCA      360
CGTACAACGA ACCGGCGCAC ATCGCCGCCC GCTTCGCCTC CCTCGACCAC CTCAGCGGGC      420
GCCGGGCCGG CTGGAACGTC GTCACCTCCG CCGCACCGTG GGAGTCCGCC AACTTCGGCT      480
TCCCCGAGCA CCTGGAGCAC GGCAAACGCT ACGAGCGGGC CGAGGAGTTC ATCGACGTGC      540

```

TCAAAAACT	GTGGGACAGC	GACGGCCGCC	CCGTCGACCA	CCGCGGCACC	CACTTCGAGG	600
CCCCCGGCC	GCTCGGGATC	CCCCGCCCCC	CGCAGGGCCG	CCCCGTCATC	ATCCAGGCCG	660
GCTCCTCGCC	GGTGGGACGC	GAGTTCGCCG	CCCGGCACGC	CGAGGTCATC	TTCACCCGGC	720
ACAACCGGCT	CTCCGACGCC	CAGGACTTCT	ACGGCGACCT	CAAGGCACGC	GTCGCCCGGC	780
ACGGCCGCGA	CCCCGAGAAG	GTCTTCGTGT	GGCCGACCCT	CGCGCCGATC	GTCGCCGCCA	840
CCGACACCGA	GGCGAAGCAG	CGCCTGCAGG	AACTGCAGGA	CCTCACCCAC	GACCATGTCTG	900
CCCTGCGCAC	CCTTCAGGAC	CACCTCGGCG	ACGTCGACCT	GAGCGCGTAC	CCGATCGACG	960
GGCCCGTCCC	CGACATCCCC	TACACCAACC	AGTCCCAGTC	GACGACCGAG	CGGCTGATCG	1020
GCCTGGCCAG	GCGCGAGAAC	CTCAGCATCC	GCGAGCTGGC	CCTGCGGCTG	ATGGGCGACA	1080
TCGTCTGTCG	CACACCGGAG	CAGCTCGCCG	ACCACATGGA	GAGCTGGTTC	ACCGGCCGCG	1140
GCGCCGACGG	CTTCAACATC	GACTTCCCGT	ACCTGCCGGG	CTCCGCCGAC	GACTTCGTCTG	1200
ACCACGTGGT	GGCCGAAC TG	CAGCGCCGCG	GCCTGTACCG	CTCGGGCTAC	GAGGGCACCA	1260
CCCTGCGGGC	CAACCTCGGC	ATCGACGCCC	CCC GGAAGGC	AGGTGCAGCG	GCTTGACTTC	1320
CGTCTCTAAAG	GCGGGGGATT	CCAGCGGTCG	CCC GCTGGGG	TTCCTGCTTC	ACCGACGACC	1380
GGCCCGTCCG	GGAGGACTCC	CGTTGAGGTC	TTATACCGTC	TCCACAGGCC	GACGCCGCCA	1440
GGCCGGCGGC	CAGGATGTTG	CGTGCCGCAT	TCACGTCGCG	GTCATGCACA	GCGCCGCAGT	1500
CGCACGTCCA	CTCCCGGACG	TTCAGCGGCA	GCTTCCCGCG	GACCGTGCCG	CAGGTTCCGC	1560
ACAGCTTGGA	GCTGGGGAAC	CAGCGGTCGA	TCACGACGAG	TTCGCGCCCA	TACCAGGCGC	1620
ACTTGTA CTC	CAGCATGGAG	CGCAGTTCGG	TCCAGGCCGC	GTCGGAGATG	GCGCGCGCGA	1680
GCTTGCCGTT	CTTCAGCAGG	TTGCGGACGG	TGAGGTCCTC	GATCACGACC	GTTTGGTTCT	1740
CACGGACGAG	TCGAGTCGAC	AGCTTGTTGA	GGAAGTCGCA	GCGCCGGTCG	GTGATCCGGG	1800
CGTGGACGCG	GGCGACCTTG	CGGCGGGCTT	TCTTCCGGTT	CGCCGACCCC	TTCGCCTTGC	1860
GCGACACGTC	CCGCTGAGCC	TTCGCGAGGC	GGGCGCGGTC	ACGGCGCTCG	TGCTTGGGGT	1920
TGGTGATCTT	CTCCCCGGTG	GACAGGGTCA	CCAGGGAGGT	GATCCCGGCG	TCGATGCCGA	1980
CGGCCGCCGT	GGTGGCGGGC	GCGGGGGTGA	TGGTGTCCCT	GCACAGCAGG	GACACGAACC	2040
AGCGGCCCCG	ACGGTCGCGG	GACACGGTCA	CCGTCGTCGG	CTCCGCCCTT	TCGGGAAGGG	2100
GACGGGACCA	GCGGATGTCC	AGGGGCTCCG	CGGTCTTCGC	CAGCGTGAGC	TGTCCGTTAC	2160
GCCACGTGAA	GGCGCTGCGG	GTGTACTCGG	CCGACGCCCT	GGACTTTTTC	CGCGACTTGT	2220
ACCGCGGGTA	CTTCGACCGC	TTGGCGAAGA	AGTTGGCGAA	CGCCGTCTGC	AAGTGCCGCA	2280
GCGCCTGCTG	GAGCGGGACG	GAGGACACCT	CCGAGAGGAA	GGCGAGTTCT	TCGGTCTTCT	2340
TCCACTCCGT	CAGCGCGGCG	GACGACTGCA	CGTAGGAGAC	CCGGCGCTGC	TCGCCGTACC	2400

AGGCTCGCGT	GCGCCCTCA	AGCGCCTTGT	TGTACACGAG	GCGGACACAG	CCGAACGTGC	2460
GGGACAGCTC	AGCCGCCTGC	TCGTCCGTGG	GATAAAAGCG	GTACTTGAAA	GCCCGCTTGA	2520
CCTGCTGCAT	CACGCCTCAC	ACGCTATCAG	TTCCCGTGTG	AGCGGCGGGT	GTCTGCCGGT	2580
GGTTGCAGAC	GCCGAACCGC	CCTGGCGGCG	ATTGCCCCAT	CCCTGCCCTG	CTCCGCAAGA	2640
GCTTCGTCTC	CTCCCCGGTC	TGAAGGCCGG	GGTATCCACG	AAGGAATTCT	GATGACCGCG	2700
CCCATCCTCG	TCGCCACCCT	CGACACCGC	GGCCCCGCG	CCACCTCGG	CACGATCACC	2760
CGCGCCGTGC	GGGCCGCGGA	GGCCGCGGGA	TTGACGCGG	TCCTGATCGA	CGACCGGGCC	2820
GCCGCCGGCG	TCCAGGGCCG	GTTGAGACG	ACGACGCTGA	CCGCCGCGCT	GGCCGCCGTC	2880
ACCGAGCACA	TCGGCCTGAT	CACCGCCCCG	CTCCGCGCG	ACCAGGCCCC	CTACCACGTG	2940
TCCCGGATCA	CCGCCTCGCT	CGACCACCTC	GCCCACGGCC	GCACCGGCTG	GCTCGCGAGC	3000
ACGGACACCA	CCGACCCCGA	GGGCCGCACC	GGGGAATCA	TCGACGTGCT	CCGCGGCCTG	3060
TGGGACAGCT	TCGACGACGA	CGCCTTCGTC	CACGACCGCG	CCGACGGCCT	GTACTGGCGG	3120
CTGCCCCGCG	TCCACCAACT	CGACCACCAG	GGCAGGCACT	TCGACGTGGC	CGGCCCCCTC	3180
AACGTCGCCC	GCCCGCCGCA	GGGCCACCCC	GTCGTCGCGG	TCACCGGCCC	CGCCCTCGCC	3240
GCGGCCGCGG	ACCTCGTCCT	GCTCGACGAG	GCGGCCGACG	CCGCCTCGGT	GAAGCAGCAG	3300
GCACCGCACG	CCAAGATCCT	CCTGCCGCTG	CCCGGCCCGG	CCGCCGAATC	GCCCGCCGAC	3360
AGCCCCGCGG	ACGGCTTCAC	GGTGGCGCTC	ACCGGCTCCG	ACGACCCGGT	CCTGGCCGCG	3420
CTCGCCGCCC	GGCCCGGCCG	CCCGGACCGC	ACCGCGGCCA	CCACCCTGCG	CGAACGCCTG	3480
GGCCTGGCCC	GCCCCGAGAG	CCGCCACGCC	CTCACCACCG	CCTGACGACC	CGTCCGCCCC	3540
CTGCTTCCTG	GAGAGTCATG	TCCCGTCGCC	TGTTACCTC	GGAGTCCGTG	ACCGAGGGCC	3600
ACCCCGACAA	GATCGCCGAC	CAGATCAGTG	ACACCGTCCT	CGACGCCCTG	CTGCGCGAGG	3660
ACCCCGCCTC	ACGCGTCGCG	GTCGAGACCC	TGATCACCAC	CGGCCAGGTC	CACATCGCCG	3720
GCGAGGTCAC	CACCAAGGCG	TACGCGCCCA	TCGCCCAACT	GGTCCGCGAC	ACGATCCTGG	3780
CCATCGGCTA	CGACTCGTCC	GCCAAGGGCT	TCGACGGCGC	CTCCTGCGGC	GTCTCCGTCT	3840
CCATCGGCGC	GCAGTCCCCG	GACATCGCCC	AGGGCGTCGA	CAGCGCTTAC	GAGACCCGCG	3900
TCGAGGGCGA	GGACGACGAG	CTCGACCAGC	AGGGCGCCGG	CGACCAGGGC	CTGATGTTTC	3960
GCTACGCCAC	CGACGAGACC	CCCTCGCTGA	TGCCGCTGCC	CATCGAGCTC	GCCCACCGCC	4020
TCTCGCGCCG	GCTCACCAG	GTCCGCAAGG	ACGGCACCGT	CCCCTACCTG	CGCCCCGACG	4080
GCAAGACCCA	GGTCACCATC	GAGTACCAGG	GCAGCCGCCC	GGTGCGCCTG	GACACCGTCG	4140
TCGTCTCCTC	CCAGCAGGCC	GCCGACATCG	ACCTCGGCTC	CCTGCTCACC	CCCACATCC	4200
GCGAGCACGT	CGTCGAGCAC	GTCTCGCCG	CACTCGCCGA	GGACGGCATC	AAGCTCGAGA	4260
CGGACAACCTA	CCGCCTGCTG	GTCAACCCGA	CCGGCCGTTT	CGAGATCGGC	GGCCCGATGG	4320

GCGACGCCGG CCTGACCGGC CGCAAGATCA TCATCGACAC GTACGGCGGC ATGGCCCGCC 4380
 ACGGCGGTGG CGCGTTCTCC GGCAAGGACC CGTCCAAGGT CGACCGTTCC GCCGCGTACG 4440
 CGATGCGCTG GGTGCGCAAG AACGTCGTCG CCGCGGGCCT CGCCTCCCGC TGCAGAGTCC 4500
 AGGTGCGCTA CGCCATCGGC AAGGCCGAGC CGGTGCGCCT GTTCGTCGAG ACGTTCGGCA 4560
 CCGGCACCGT CGCCCAGGAG CGCATCGAGA AGGCCATCAC CGAGGTCTTC GACCTGCGCC 4620
 CCGCGGCCAT CATCCGCGAC CTCGACCTGC TCGGGCCCAT CTACGCCGCC ACCGCCGCTT 4680
 ACGGCCACTT CGGCCGCGAA CTGCCCGACT TCACCTGGGA GCGGACCGAC CGCGCCCACC 4740
 GGCTCAAGGC CGCGGCCGGT CTCTGAGCCG GCCGGACCTG TGAGGAGACC TGACGTGCGC 4800
 ATCGCTGTCA CCGGTTCCAT CGCCACCGAC CATCTGATGG TCTTCCCCGG CCGGTTGCGG 4860
 GATCAGCTGA TCCCCGACCA GCTCGCTCAT GTCTCGCTCT CTTTCTTGGT CGACGCACTC 4920
 GAGGTGCGCC GGGGCGGAGT GCGGACAAC GTCGCCTTCG GCCTCGGCGG CCTCGGCCTC 4980
 ACCCCCCAGC TGGTCGGCGC CGTGGGCAGC GACTTCGCCG AGTACGAGGT CTGGCTCAAG 5040
 GAACACGGCG TCGACACCGG CCCCGTCCTG GTCTCCACCG AGCGGCAGAC CGCCCGGTTT 5100
 ATGTGCATCA CCGACCAGGA CTCCAACCAG ATCGCCTCCT TCTACGCGGG CGCCATGCAA 5160
 GAGGCCCGCG ACATCGACCT GTGGCACCTG ACCACCGGCA GCGTCCGCCC CGACCTCGTC 5220
 CTGGTCTGCC CGAACGACCC GCGGCGGATG CTGCGCCACA CGGGGAGTGC CGCGAAACTG 5280
 GGCCTGCCGT TCGCCGCCGA CCCCTCCAG CAGCTCGCCC GCCTGGAGGG AGGGAGGTAC 5340
 GCGAACTCGG TCGACGGGGC CCGTTGGTTT TTCACCAACG AAGTACGAGG CC 5392

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1269 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucl,ique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Streptomyces pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMMENT: 1..1269

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ATG ACC GCA CCC CGC CGG CGC ATC ACC CTC GCC GGC ATC ATC GAC GGC 48
 Met Thr Ala Pro Arg Arg Ile Thr Leu Ala Gly Ile Ile Asp Gly

1	5				10				15							
CCC Pro	GGC Gly	GGC Gly	CAT His 20	GTG Val	GCC Ala	GCC Ala	TGG Trp	CGC Arg 25	CAC His	CCG Pro	GCG Ala	ACC Thr	AAG Lys 30	GCG Ala	GAC Asp	96
GCC Ala	CAG Gln	CTC Leu 35	GAC Asp	TTC Phe	GAA Glu	TTC Phe	CAC His 40	CGC Arg	GAC Asp	AAC Asn	GCC Ala	CGC Arg 45	ACC Thr	CTC Leu	GAA Glu	144
CGC Arg	GGC Gly 50	CTG Leu	TTC Phe	GAC Asp	GCC Ala	GTG Val 55	TTC Phe	ATC Ile	GCG Ala	GAC Asp	ATC Ile 60	GTC Val	GCC Ala	GTG Val	TGG Trp	192
GGC Gly 65	ACC Thr	CGC Arg	CTG Leu	GAC Asp	TCC Ser 70	CTG Leu	TGC Cys	CGC Arg	ACC Thr	TCG Ser 75	CGC Arg	ACC Thr	GAG Glu	CAC His	TTC Phe 80	240
GAA Glu	CCG Pro	CTC Leu	ACC Thr 85	CTG Leu	CTC Leu	GCC Ala	GCC Ala	TAC Tyr 90	GCC Ala	GCG Ala	GTC Val	ACC Thr	GAG Glu	CAC His 95	ATC Ile	288
GGC Gly	CTG Leu	TGC Cys 100	GCC Ala	ACC Thr	GCC Ala	ACC Thr	ACC Thr	ACG Thr 105	TAC Tyr	AAC Asn	GAA Glu	CCG Pro	GCG Ala 110	CAC His	ATC Ile	336
GCC Ala	GCC Ala	CGC Arg 115	TTC Phe	GCC Ala	TCC Ser	CTC Leu	GAC Asp 120	CAC His	CTC Leu	AGC Ser	GGC Gly 125	GGC Gly	CGG Arg	GCC Ala	GGC Gly	384
TGG Trp	AAC Asn 130	GTC Val	GTC Val	ACC Thr	TCC Ser	GCC Ala 135	GCA Ala	CCG Pro	TGG Trp	GAG Glu	TCC Ser 140	GCC Ala	AAC Asn	TTC Phe	GGC Gly	432
TTC Phe 145	CCC Pro	GAG Glu	CAC His	CTG Leu 150	GAG Glu 150	CAC His	GGC Gly	AAA Lys	CGC Arg	TAC Tyr 155	GAG Glu	CGG Arg	GCC Ala	GAG Glu	GAG Glu 160	480
TTC Phe	ATC Ile	GAC Asp	GTC Val 165	GTC Val	AAA Lys	AAA Lys	CTG Leu	TGG Trp	GAC Asp 170	AGC Ser	GAC Asp	GGC Gly	CGC Arg	CCC Pro	GTC Val 175	528
GAC Asp	CAC His	CGC Arg	GGC Gly 180	ACC Thr	CAC His	TTC Phe	GAG Glu 185	GCC Ala	CCC Pro	GGC Gly	CCG Pro	CTC Leu	GGG Gly 190	ATC Ile	GCC Ala	576
CGC Arg	CCC Pro	CCG Pro 195	CAG Gln	GGC Gly	CGC Arg	CCC Pro	GTC Val 200	ATC Ile	ATC Ile	CAG Gln	GCC Ala	GGC Gly 205	TCC Ser	TCG Ser	CCG Pro	624
GTG Val 210	GGA Gly	CGC Arg	GAG Glu	TTC Phe	GCC Ala	GCC Ala 215	CGG Arg	CAC His	GCC Ala	GAG Glu	GTC Val 220	ATC Ile	TTC Phe	ACC Thr	CGG Arg	672
CAC His 225	AAC Asn	CGG Arg	CTC Leu	TCC Ser	GAC Asp 230	GCC Ala	CAG Gln	GAC Asp	TTC Phe	TAC Tyr 235	GGC Gly	GAC Asp	CTC Leu	AAG Lys	GCA Ala 240	720
CGC Arg	GTC Val	GCC Ala	CGG Arg	CAC His 245	GGC Gly	CGC Arg	GAC Asp	CCC Pro	GAG Glu 250	AAG Lys	GTC Val	CTC Leu	GTG Val	TGG Trp 255	CCG Pro	768
ACC	CTC	GCG	CCG	ATC	GTC	GCC	GCC	ACC	GAC	ACC	GAG	GCG	AAG	CAG	CGC	816

Thr	Leu	Ala	Pro	Ile	Val	Ala	Ala	Thr	Asp	Thr	Glu	Ala	Lys	Gln	Arg	
			260					265					270			
CTG	CAG	GAA	CTG	CAG	GAC	CTC	ACC	CAC	GAC	CAT	GTC	GCC	CTG	CGC	ACC	864
Leu	Gln	Glu	Leu	Gln	Asp	Leu	Thr	His	Asp	His	Val	Ala	Leu	Arg	Thr	
		275					280					285				
CTT	CAG	GAC	CAC	CTC	GGC	GAC	GTC	GAC	CTG	AGC	GCG	TAC	CCG	ATC	GAC	912
Leu	Gln	Asp	His	Leu	Gly	Asp	Val	Asp	Leu	Ser	Ala	Tyr	Pro	Ile	Asp	
		290				295					300					
GGG	CCC	GTC	CCC	GAC	ATC	CCG	TAC	ACC	AAC	CAG	TCC	CAG	TCG	ACG	ACC	960
Gly	Pro	Val	Pro	Asp	Ile	Pro	Tyr	Thr	Asn	Gln	Ser	Gln	Ser	Thr	Thr	
305					310					315					320	
GAG	CGG	CTG	ATC	GGC	CTG	GCC	AGG	CGC	GAG	AAC	CTC	AGC	ATC	CGC	GAG	1008
Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Leu	Ala	Arg	Arg	Glu	Asn	Leu	Ser	Ile	Arg	Glu	
				325					330					335		
CTG	GCC	CTG	CGG	CTG	ATG	GGC	GAC	ATC	GTC	GTC	GGC	ACA	CCG	GAG	CAG	1056
Leu	Ala	Leu	Arg	Leu	Met	Gly	Asp	Ile	Val	Val	Gly	Thr	Pro	Glu	Gln	
			340					345					350			
CTC	GCC	GAC	CAC	ATG	GAG	AGC	TGG	TTC	ACC	GGC	CGC	GGC	GCC	GAC	GGC	1104
Leu	Ala	Asp	His	Met	Glu	Ser	Trp	Phe	Thr	Gly	Arg	Gly	Ala	Asp	Gly	
		355					360					365				
TTC	AAC	ATC	GAC	TTC	CCG	TAC	CTG	CCG	GGC	TCC	GCC	GAC	GAC	TTC	GTC	1152
Phe	Asn	Ile	Asp	Phe	Pro	Tyr	Leu	Pro	Gly	Ser	Ala	Asp	Asp	Phe	Val	
		370				375					380					
GAC	CAC	GTG	GTG	CCC	GAA	CTG	CAG	CGC	CGC	GGC	CTG	TAC	CGC	TCG	GGC	1200
Asp	His	Val	Val	Pro	Glu	Leu	Gln	Arg	Arg	Gly	Leu	Tyr	Arg	Ser	Gly	
385					390					395					400	
TAC	GAG	GGC	ACC	ACC	CTG	CGG	GCC	AAC	CTC	GGC	ATC	GAC	GCC	CCC	CGG	1248
Tyr	Glu	Gly	Thr	Thr	Leu	Arg	Ala	Asn	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Pro	Arg	
			405					410						415		
AAG	GCA	GGT	GCA	GCG	GCT	TG										1269
Lys	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala											
			420													

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 422 acides amin,s

(B) TYPE: acide amin,

(D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Met	Thr	Ala	Pro	Arg	Arg	Arg	Ile	Thr	Leu	Ala	Gly	Ile	Ile	Asp	Gly	
1				5					10					15		
Pro	Gly	Gly	His	Val	Ala	Ala	Trp	Arg	His	Pro	Ala	Thr	Lys	Ala	Asp	
			20					25					30			
Ala	Gln	Leu	Asp	Phe	Glu	Phe	His	Arg	Asp	Asn	Ala	Arg	Thr	Leu	Glu	
		35					40					45				

Arg Gly Leu Phe Asp Ala Val Phe Ile Ala Asp Ile Val Ala Val Trp
 50 55 60
 Gly Thr Arg Leu Asp Ser Leu Cys Arg Thr Ser Arg Thr Glu His Phe
 65 70 75 80
 Glu Pro Leu Thr Leu Leu Ala Ala Tyr Ala Ala Val Thr Glu His Ile
 85 90 95
 Gly Leu Cys Ala Thr Ala Thr Thr Tyr Asn Glu Pro Ala His Ile
 100 105 110
 Ala Ala Arg Phe Ala Ser Leu Asp His Leu Ser Gly Gly Arg Ala Gly
 115 120 125
 Trp Asn Val Val Thr Ser Ala Ala Pro Trp Glu Ser Ala Asn Phe Gly
 130 135 140
 Phe Pro Glu His Leu Glu His Gly Lys Arg Tyr Glu Arg Ala Glu Glu
 145 150 155 160
 Phe Ile Asp Val Val Lys Lys Leu Trp Asp Ser Asp Gly Arg Pro Val
 165 170 175
 Asp His Arg Gly Thr His Phe Glu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Ile Ala
 180 185 190
 Arg Pro Pro Gln Gly Arg Pro Val Ile Ile Gln Ala Gly Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Gly Arg Glu Phe Ala Ala Arg His Ala Glu Val Ile Phe Thr Arg
 210 215 220
 His Asn Arg Leu Ser Asp Ala Gln Asp Phe Tyr Gly Asp Leu Lys Ala
 225 230 235 240
 Arg Val Ala Arg His Gly Arg Asp Pro Glu Lys Val Leu Val Trp Pro
 245 250 255
 Thr Leu Ala Pro Ile Val Ala Ala Thr Asp Thr Glu Ala Lys Gln Arg
 260 265 270
 Leu Gln Glu Leu Gln Asp Leu Thr His Asp His Val Ala Leu Arg Thr
 275 280 285
 Leu Gln Asp His Leu Gly Asp Val Asp Leu Ser Ala Tyr Pro Ile Asp
 290 295 300
 Gly Pro Val Pro Asp Ile Pro Tyr Thr Asn Gln Ser Gln Ser Thr Thr
 305 310 315 320
 Glu Arg Leu Ile Gly Leu Ala Arg Arg Glu Asn Leu Ser Ile Arg Glu
 325 330 335
 Leu Ala Leu Arg Leu Met Gly Asp Ile Val Val Gly Thr Pro Glu Gln
 340 345 350
 Leu Ala Asp His Met Glu Ser Trp Phe Thr Gly Arg Gly Ala Asp Gly
 355 360 365
 Phe Asn Ile Asp Phe Pro Tyr Leu Pro Gly Ser Ala Asp Asp Phe Val
 370 375 380

Asp His Val Val Pro-Glu Leu Gln Arg Arg Gly Leu Tyr Arg Ser Gly
 385 390 395 400
 Tyr Glu Gly Thr Thr Leu Arg Ala Asn Leu Gly Ile Asp Ala Pro Arg
 405 410 415
 Lys Ala Gly Ala Ala Ala
 420

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 834 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucl,ique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 1..834

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

ATG ACC GCG CCC ATC CTC GTC GCC ACC CTC GAC ACC CGC GGC CCC GCC	48
Met Thr Ala Pro Ile Leu Val Ala Thr Leu Asp Thr Arg Gly Pro Ala	
1 5 10 15	
GCC ACC CTC GGC ACG ATC ACC CGC GCC GTG CGG GCC GCG GAG GCC GCC	96
Ala Thr Leu Gly Thr Ile Thr Arg Ala Val Arg Ala Ala Glu Ala Ala	
20 25 30	
GGA TTC GAC GCC GTC CTG ATC GAC GAC CGG GCC GCC GCC GGC GTC CAG	144
Gly Phe Asp Ala Val Leu Ile Asp Asp Arg Ala Ala Ala Gly Val Gln	
35 40 45	
GGC CGG TTC GAG ACG ACG ACG CTG ACC GCC GCG CTG GCC GCC GTC ACC	192
Gly Arg Phe Glu Thr Thr Leu Thr Ala Ala Leu Ala Ala Val Thr	
50 55 60	
GAG CAC ATC GGC CTG ATC ACC GCC CCG CTC CCG GCC GAC CAG GCC CCC	240
Glu His Ile Gly Leu Ile Thr Ala Pro Leu Pro Ala Asp Gln Ala Pro	
65 70 75 80	
TAC CAC GTG TCC CGG ATC ACC GCC TCG CTC GAC CAC CTC GCC CAC GGC	288
Tyr His Val Ser Arg Ile Thr Ala Ser Leu Asp His Leu Ala His Gly	
85 90 95	
CGC ACC GGC TGG CTC GCG AGC ACG GAC ACC ACC GAC CCC GAG GGC CGC	336
Arg Thr Gly Trp Leu Ala Ser Thr Asp Thr Thr Asp Pro Glu Gly Arg	
100 105 110	

ACC GGC GAA CTC ATC GAC GTC GTC CGC GGC CTG TGG GAC AGC TTC GAC	384
Thr Gly Glu Leu Ile Asp Val Val Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Asp	
115 120 125	
GAC GAC GCC TTC GTC CAC GAC CGC GCC GAC GGC CTG TAC TGG CGG CTG	432
Asp Asp Ala Phe Val His Asp Arg Ala Asp Gly Leu Tyr Trp Arg Leu	
130 135 140	
CCC GCC GTC CAC CAA CTC GAC CAC CAG GGC AGG CAC TTC GAC GTG GCC	480
Pro Ala Val His Gln Leu Asp His Gln Gly Arg His Phe Asp Val Ala	
145 150 155 160	
GGC CCC CTC AAC GTC GCC CGC CCG CCG CAG GGC CAC CCC GTC GTC GCC	528
Gly Pro Leu Asn Val Ala Arg Pro Pro Gln Gly His Pro Val Val Ala	
165 170 175	
GTC ACC GGC CCC GCC CTC GCC GCG GCC GCC GAC CTC GTC CTG CTC GAC	576
Val Thr Gly Pro Ala Leu Ala Ala Ala Asp Leu Val Leu Leu Asp	
180 185 190	
GAG GCG GCC GAC GCC GCC TCG GTG AAG CAG CAG GCA CCG CAC GCC AAG	624
Glu Ala Ala Asp Ala Ala Ser Val Lys Gln Gln Ala Pro His Ala Lys	
195 200 205	
ATC CTC CTG CCG CTG CCC GGC CCG GCC GCC GAA CTG CCC GCC GAC AGC	672
Ile Leu Leu Pro Leu Pro Gly Pro Ala Ala Glu Leu Pro Ala Asp Ser	
210 215 220	
CCC GCG GAC GGC TTC ACG GTG GCG CTC ACC GGC TCC GAC GAC CCG GTC	720
Pro Ala Asp Gly Phe Thr Val Ala Leu Thr Gly Ser Asp Asp Pro Val	
225 230 235 240	
CTG GCC GCG CTC GCC GCC CGG CCC GGC CGC CCG GAC CGC ACC GCG GCC	768
Leu Ala Ala Leu Ala Ala Arg Pro Gly Arg Pro Asp Arg Thr Ala Ala	
245 250 255	
ACC ACC CTG CGC GAA CGC CTG GGC CTG GCC CGC CCC GAG AGC CGC CAC	816
Thr Thr Leu Arg Glu Arg Leu Gly Leu Ala Arg Pro Glu Ser Arg His	
260 265 270	
GCC CTC ACC ACC GCC TG	834
Ala Leu Thr Thr Ala	
275	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 277 acides amin,s

(B) TYPE: acide amin,

(D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Met Thr Ala Pro Ile Leu Val Ala Thr Leu Asp Thr Arg Gly Pro Ala
1 5 10 15
Ala Thr Leu Gly Thr Ile Thr Arg Ala Val Arg Ala Ala Glu Ala Ala
20 25 30
Gly Phe Asp Ala Val Leu Ile Asp Asp Arg Ala Ala Ala Gly Val Gln

35					40					45					
Gly	Arg	Phe	Glu	Thr	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Val	Thr
50						55					60				
Glu	His	Ile	Gly	Leu	Ile	Thr	Ala	Pro	Leu	Pro	Ala	Asp	Gln	Ala	Pro
65					70					75					80
Tyr	His	Val	Ser	Arg	Ile	Thr	Ala	Ser	Leu	Asp	His	Leu	Ala	His	Gly
				85					90					95	
Arg	Thr	Gly	Trp	Leu	Ala	Ser	Thr	Asp	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu	Gly	Arg
			100				105						110		
Thr	Gly	Glu	Leu	Ile	Asp	Val	Val	Arg	Gly	Leu	Trp	Asp	Ser	Phe	Asp
		115					120					125			
Asp	Asp	Ala	Phe	Val	His	Asp	Arg	Ala	Asp	Gly	Leu	Tyr	Trp	Arg	Leu
130						135					140				
Pro	Ala	Val	His	Gln	Leu	Asp	His	Gln	Gly	Arg	His	Phe	Asp	Val	Ala
145					150					155					160
Gly	Pro	Leu	Asn	Val	Ala	Arg	Pro	Pro	Gln	Gly	His	Pro	Val	Val	Ala
			165						170					175	
Val	Thr	Gly	Pro	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu	Val	Leu	Leu	Asp
			180				185					190			
Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ser	Val	Lys	Gln	Gln	Ala	Pro	His	Ala	Lys
		195					200					205			
Ile	Leu	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Pro	Ala	Ala	Glu	Leu	Pro	Ala	Asp	Ser
210						215					220				
Pro	Ala	Asp	Gly	Phe	Thr	Val	Ala	Leu	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Pro	Val
225					230					235					240
Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Arg	Pro	Asp	Arg	Thr	Ala	Ala
				245					250					255	
Thr	Thr	Leu	Arg	Glu	Arg	Leu	Gly	Leu	Ala	Arg	Pro	Glu	Ser	Arg	His
			260					265					270		
Ala	Leu	Thr	Thr	Ala											
			275												

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 1209 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucl,ique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: double
 - (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Streptomyces pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLACEMENT: 1..1209

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

ATG TCC CGT CGC CTG TTC ACC TCG GAG TCC GTG ACC GAG GGC CAC CCC	48
Met Ser Arg Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr Glu Gly His Pro	
1 5 10 15	
GAC AAG ATC GCC GAC CAG ATC AGT GAC ACC GTG CTC GAC GCC CTG CTG	96
Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Thr Val Leu Asp Ala Leu Leu	
20 25 30	
CGC GAG GAC CCC GCC TCA CGC GTC GCG GTC GAG ACC CTG ATC ACC ACC	144
Arg Glu Asp Pro Ala Ser Arg Val Ala Val Glu Thr Leu Ile Thr Thr	
35 40 45	
GGC CAG GTC CAC ATC GCC GGC GAG GTC ACC ACC AAG GCG TAC GCG CCC	192
Gly Gln Val His Ile Ala Gly Glu Val Thr Thr Lys Ala Tyr Ala Pro	
50 55 60	
ATC GCC CAA CTG GTC CGC GAC ACG ATC CTG GCC ATC GGC TAC GAC TCG	240
Ile Ala Gln Leu Val Arg Asp Thr Ile Leu Ala Ile Gly Tyr Asp Ser	
65 70 75 80	
TCC GCC AAG GGC TTC GAC GGC GCC TCC TGC GGC GTC TCC GTC TCC ATC	288
Ser Ala Lys Gly Phe Asp Gly Ala Ser Cys Gly Val Ser Val Ser Ile	
85 90 95	
GGC GCG CAG TCC CCG GAC ATC GCC CAG GGC GTC GAC AGC GCC TAC GAG	336
Gly Ala Gln Ser Pro Asp Ile Ala Gln Gly Val Asp Ser Ala Tyr Glu	
100 105 110	
ACC CGC GTC GAG GGC GAG GAC GAC GAG CTC GAC CAG CAG GGC GCC GGC	384
Thr Arg Val Glu Gly Glu Asp Asp Glu Leu Asp Gln Gln Gly Ala Gly	
115 120 125	
GAC CAG GGC CTG ATG TTC GGC TAC GCC ACC GAC GAG ACC CCC TCG CTG	432
Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asp Glu Thr Pro Ser Leu	
130 135 140	
ATG CCG CTG CCC ATC GAG CTC GCC CAC CGC CTC TCG CGC CGG CTC ACC	480
Met Pro Leu Pro Ile Glu Leu Ala His Arg Leu Ser Arg Arg Leu Thr	
145 150 155 160	
GAG GTC CGC AAG GAC GGC ACC GTC CCC TAC CTG CGC CCC GAC GGC AAG	528
Glu Val Arg Lys Asp Gly Thr Val Pro Tyr Leu Arg Pro Asp Gly Lys	
165 170 175	
ACC CAG GTC ACC ATC GAG TAC CAG GGC AGC CGC CCG GTG CGC CTG GAC	576
Thr Gln Val Thr Ile Glu Tyr Gln Gly Ser Arg Pro Val Arg Leu Asp	
180 185 190	
ACC GTC GTC GTC TCC TCC CAG CAC GCC GCC GAC ATC GAC CTC GGC TCC	624
Thr Val Val Val Ser Ser Gln His Ala Ala Asp Ile Asp Leu Gly Ser	
195 200 205	
CTG CTC ACC CCC GAC ATC CGC GAG CAC GTC GTC GAG CAC GTC CTC GCC	672
Leu Leu Thr Pro Asp Ile Arg Glu His Val Val Glu His Val Leu Ala	

210	215	220	
GCA CTC GCC GAG GAC GGC ATC AAG CTC GAG ACG GAC AAC TAC CGC CTG Ala Leu Ala Glu Asp Gly Ile Lys Leu Glu Thr Asp Asn Tyr Arg Leu 225 230 235 240			720
CTG GTC AAC CCG ACC GGC CGT TTC GAG ATC GGC GGC CCG ATG GGC GAC Leu Val Asn Pro Thr Gly Arg Phe Glu Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp 245 250 255			768
GCC GGC CTG ACC GGC CGC AAG ATC ATC ATC GAC ACG TAC GGC GGC ATG Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Ile Asp Thr Tyr Gly Gly Met 260 265 270			816
GCC CGC CAC GGC GGT GGC GCG TTC TCC GGC AAG GAC CCG TCC AAG GTC Ala Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val 275 280 285			864
GAC CGT TCC GCC GCG TAC GCG ATG CGC TGG GTC GCC AAG AAC GTC GTC Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn Val Val 290 295 300			912
GCC GCG GGC CTC GCC TCC CGC TGC GAG GTC CAG GTC GCC TAC GCC ATC Ala Ala Gly Leu Ala Ser Arg Cys Glu Val Gln Val Ala Tyr Ala Ile 305 310 315 320			960
GGC AAG GCC GAG CCG GTC GGC CTG TTC GTC GAG ACG TTC GGC ACC GGC Gly Lys Ala Glu Pro Val Gly Leu Phe Val Glu Thr Phe Gly Thr Gly 325 330 335			1008
ACC GTC GCC CAG GAG CGC ATC GAG AAG GCC ATC ACC GAG GTC TTC GAC Thr Val Ala Gln Glu Arg Ile Glu Lys Ala Ile Thr Glu Val Phe Asp 340 345 350			1056
CTG CGC CCC GCG GCC ATC ATC CGC GAC CTC GAC CTG CTG CGG CCC ATC Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Asp Leu Asp Leu Leu Arg Pro Ile 355 360 365			1104
TAC GCC GCC ACC GCC GCC TAC GGC CAC TTC GGC CGC GAA CTG CCC GAC Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu Leu Pro Asp 370 375 380			1152
TTC ACC TGG GAG CGG ACC GAC CGC GCC CAC CGG CTC AAG GCC GCG GCC Phe Thr Trp Glu Arg Thr Asp Arg Ala His Arg Leu Lys Ala Ala Ala 385 390 395 400			1200
GGT CTC TG Gly Leu			1209

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 402 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Met Ser Arg Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr Glu Gly His Pro

1	5	10	15
Asp Lys Ile Ala	Asp Gln Ile Ser	Asp Thr Val Leu	Asp Ala Leu Leu
20	25	30	
Arg Glu Asp Pro	Ala Ser Arg Val	Ala Val Glu Thr	Leu Ile Thr Thr
35	40	45	
Gly Gln Val His	Ile Ala Gly Glu	Val Thr Thr Lys	Ala Tyr Ala Pro
50	55	60	
Ile Ala Gln Leu	Val Arg Asp Thr	Ile Leu Ala Ile	Gly Tyr Asp Ser
65	70	75	80
Ser Ala Lys Gly	Phe Asp Gly Ala	Ser Cys Gly Val	Ser Val Ser Ile
85	90	95	
Gly Ala Gln Ser	Pro Asp Ile Ala	Gln Gly Val Asp	Ser Ala Tyr Glu
100	105	110	
Thr Arg Val Glu	Gly Glu Asp Asp	Glu Leu Asp Gln	Gln Gly Ala Gly
115	120	125	
Asp Gln Gly Leu	Met Phe Gly Tyr	Ala Thr Asp Glu	Thr Pro Ser Leu
130	135	140	
Met Pro Leu Pro	Ile Glu Leu Ala	His Arg Leu Ser	Arg Arg Leu Thr
145	150	155	160
Glu Val Arg Lys	Asp Gly Thr Val	Pro Tyr Leu Arg	Pro Asp Gly Lys
165	170	175	
Thr Gln Val Thr	Ile Glu Tyr Gln	Gly Ser Arg Pro	Val Arg Leu Asp
180	185	190	
Thr Val Val Val	Ser Ser Gln His	Ala Ala Asp Ile	Asp Leu Gly Ser
195	200	205	
Leu Leu Thr Pro	Asp Ile Arg Glu	His Val Val Glu	His Val Leu Ala
210	215	220	
Ala Leu Ala Glu	Asp Gly Ile Lys	Leu Glu Thr Asp	Asn Tyr Arg Leu
225	230	235	240
Leu Val Asn Pro	Thr Gly Arg Phe	Glu Ile Gly Gly	Pro Met Gly Asp
245	250	255	
Ala Gly Leu Thr	Gly Arg Lys Ile	Ile Ile Asp Thr	Tyr Gly Gly Met
260	265	270	
Ala Arg His Gly	Gly Gly Ala Phe	Ser Gly Lys Asp	Pro Ser Lys Val
275	280	285	
Asp Arg Ser Ala	Ala Tyr Ala Met	Arg Trp Val Ala	Lys Asn Val Val
290	295	300	
Ala Ala Gly Leu	Ala Ser Arg Cys	Glu Val Gln Val	Ala Tyr Ala Ile
305	310	315	320
Gly Lys Ala Glu	Pro Val Gly Leu	Phe Val Glu Thr	Phe Gly Thr Gly
325	330	335	
Thr Val Ala Gln	Glu Arg Ile Glu	Lys Ala Ile Thr	Glu Val Phe Asp

	340		345		350
Leu Arg Pro	Ala Ala Ile Ile Arg	Asp Leu Asp Leu Leu Arg Pro Ile			
	355	360		365	
Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu Leu Pro Asp					
	370	375		380	
Phe Thr Trp Glu Arg Thr Asp Arg Ala His Arg Leu Lys Ala Ala Ala					
	385	390		395	400
Gly Leu					

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1879 paires de bases

(B) TYPE: acide nucl,ique

(C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLACEMENT: 110..1858

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GATCGGCTCC TGACGGAGCG GCGGCGCGCG GGCGCGGCGC ATCAGCGGCG TGTCAACGGC	60
GCTGCCGACA CTGGGCGCGA CGCGAGGACG AAGCCGGAAA GGACCAACG ATG CTG	115
	Met Leu
	1
GAC GGA TGC GTT CCC TGG CCC GAG GAT GTG GCC GCG AAG TAC CGG GCG	163
Asp Gly Cys Val Pro Trp Pro Glu Asp Val Ala Ala Lys Tyr Arg Ala	
	5 10 15
GCC GGC TAC TGG CGG GGC GAG CCG CTG GGC ATG CTG CTG GGC CGC TGG	211
Ala Gly Tyr Trp Arg Gly Glu Pro Leu Gly Met Leu Leu Gly Arg Trp	
	20 25 30
GCG GAG CAG TAC GGC GAG CGG GAG GCG CTG GTC GGC GCG GAC GGG TGC	259
Ala Glu Gln Tyr Gly Glu Arg Glu Ala Leu Val Gly Ala Asp Gly Cys	
	35 40 45 50
TCC CGT GTC ACC TAC CGT GCC CTG GAC CGC TGG TGC GAC CGG CTG GCG	307
Ser Arg Val Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Arg Trp Cys Asp Arg Leu Ala	
	55 60 65
GCG GGG TTC GCG GCG CGC GGG ATC GGC GCC GGC GAG CGG GTG CTG GTG	355
Ala Gly Phe Ala Ala Arg Gly Ile Gly Ala Gly Glu Arg Val Leu Val	

58

70						75						80						
CAG Gln	CTG Leu	CCG Pro	AAC Asn	ACG Thr	CCC Pro	GAG Glu	TTC Phe	GTC Val	GCG Ala	GTG Val	TGC Cys	TTC Phe	GCG Ala	CTG Leu	TTC Phe	403		
85						90						95						
CGT Arg	CTG Leu	GGC Gly	GCG Ala	CTG Leu	CCG Pro	GTG Val	TTC Phe	GCG Ala	CTG Leu	CCC Pro	GCG Ala	CAC His	CGT Arg	GCC Ala	GCC Ala	451		
100						105						110						
GAG Glu	GTG Val	GGG Gly	CAC His	CTG Leu	CTC Leu	GAG Glu	CTG Leu	TCC Ser	GGC Gly	GCC Ala	GTC Val	GCC Ala	CAC His	ATC Ile	CTG Leu	499		
115						120						125						
CCG Pro	GGC Gly	ACC Thr	GGC Gly	ACC Thr	GGC Gly	TAC Tyr	GAC Asp	CAT His	GTC Val	GCG Ala	GCG Ala	GCC Ala	GTG Val	GAG Glu	GCC Ala	547		
135						140						145						
CGT Arg	GCC Ala	CGC Arg	CGT Arg	GCC Ala	CGC Arg	CCG Pro	GTG Val	CAG Gln	GTG Val	TTC Phe	GTG Val	GCG Ala	GGC Gly	GAG Glu	GCG Ala	595		
150						155						160						
CCC Pro	GCG Ala	GTG Val	CTG Leu	CCC Pro	GAG Glu	GGG Gly	TTC Phe	ACC Thr	GCG Ala	CTG Leu	GCC Ala	GAC Asp	GTG Val	GAC Asp	GGC Gly	643		
165						170						175						
GAC Asp	CCG Pro	GTG Val	GCG Ala	CCG Pro	GCG Ala	GAC Asp	GTG Val	GAC Asp	GCC Ala	TTC Phe	CGA Arg	CGT Arg	GGC Gly	GTC Val	TTC Phe	691		
180						185						190						
CTG Leu	CTG Leu	TCC Ser	GGG Gly	GGG Gly	ACG Thr	ACC Thr	GCG Ala	CTG Leu	CCG Pro	AAG Lys	CTG Leu	ATC Ile	CCG Pro	CGC Arg	ACC Thr	739		
195						200						205						
CAC His	GAC Asp	GAC Asp	TAC Tyr	GCC Ala	TAC Tyr	CAG Gln	TGC Cys	CGG Arg	GTC Val	ACG Thr	GCC Ala	GGT Gly	ATC Ile	TGC Cys	GGC Gly	787		
215						220						225						
CTG Leu	GAC Asp	GCG Ala	GAC Asp	AGT Ser	GTC Val	TAT Tyr	CTG Leu	GCG Ala	GTG Val	CTG Leu	CCG Pro	GCC Ala	GAG Glu	TTC Phe	AAC Asn	835		
230						235						240						
TTC Phe	CCC Pro	TTC Phe	GGC Gly	TGC Cys	CCG Pro	GGC Gly	ATC Ile	CTG Leu	GGC Gly	ACC Thr	CTG Leu	CAC His	GCC Ala	GGC Gly	GGG Gly	883		
245						250						255						
CGG Arg	GTG Val	GTG Val	TTC Phe	GCG Ala	CTG Leu	TCA Ser	CCG Pro	CAG Gln	CCC Pro	GAG Glu	GAG Glu	TGC Cys	TTC Phe	GCG Ala	CTG Leu	931		
260						265						270						
ATC Ile	GAA Glu	CGC Arg	GAA Glu	CAC His	GTC Val	ACC Thr	TTC Phe	ACC Thr	TCC Ser	GTC Val	ATC Ile	CCC Pro	ACG Thr	ATC Ile	GTG Val	979		
275						280						285						
CAC His	CTG Leu	TGG Trp	CTG Leu	GCG Ala	GCC Ala	GCC Ala	GCA Ala	CAA Gln	GGC Gly	CAC His	GGC Gly	CGC Arg	GAC Asp	CTG Leu	GGC Gly	1027		
295						300						305						
AGC Ser	CTT Leu	CAG Gln	CTG Leu	CTG Leu	CAG Gln	GTC Val	GGC Gly	AGC Ser	GCC Ala	AAA Lys	CTC Leu	CAC His	GAG Glu	GAG Glu	CTC Leu	1075		
310						315						320						
GCC Gln	GCC Gln	CGG Gln	ATC Gln	GGC Gln	CCC Gln	GAA Gln	CTG Gln	GGG Gln	GTG Gln	CGG Gln	CTG Gln	CAG Gln	CAG Gln	GTG Gln	TTC Gln	1123		

Ala	Ala	Arg	Ile	Gly	Pro	Glu	Leu	Gly	Val	Arg	Leu	Gln	Gln	Val	Phe	
		325					330					335				
GGC	ATG	GCC	GAG	GGA	CTG	CTG	ACC	TTC	ACC	CGC	GAC	GAC	GAC	CCG	GCG	1171
Gly	Met	Ala	Glu	Gly	Leu	Leu	Thr	Phe	Thr	Arg	Asp	Asp	Asp	Pro	Ala	
	340					345					350					
GAC	GTG	GTG	CTG	CGC	ACC	CAG	GGC	CGG	CCG	GTG	TCC	GAG	GCC	GAC	GAG	1219
Asp	Val	Val	Leu	Arg	Thr	Gln	Gly	Arg	Pro	Val	Ser	Glu	Ala	Asp	Glu	
	355				360					365					370	
ATA	CGC	GTC	GCC	GAC	CCC	GAC	GGC	CGG	CCC	GTG	CCC	CGC	GGT	GAG	ACC	1267
Ile	Arg	Val	Ala	Asp	Pro	Asp	Gly	Arg	Pro	Val	Pro	Arg	Gly	Glu	Thr	
				375					380					385		
GGT	GAA	CTG	CTC	ACC	CGC	GGC	CCC	TAC	ACG	CTG	CGC	GGC	TAC	TAC	CGG	1315
Gly	Glu	Leu	Leu	Thr	Arg	Gly	Pro	Tyr	Thr	Leu	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Arg	
		390						395					400			
GCC	CCC	GAG	CAC	AAC	GCC	CGC	GCG	TTC	ACC	GAG	GAC	GGC	TTC	TAC	CGC	1363
Ala	Pro	Glu	His	Asn	Ala	Arg	Ala	Phe	Thr	Glu	Asp	Gly	Phe	Tyr	Arg	
		405					410					415				
AGC	GGC	GAT	CTG	GTG	CGG	CTC	ACC	GCC	GAC	GGG	CAG	TTG	GTG	GTG	GAG	1411
Ser	Gly	Asp	Leu	Val	Arg	Leu	Thr	Ala	Asp	Gly	Gln	Leu	Val	Val	Glu	
	420					425					430					
GGC	AGG	ATC	AAG	GAC	GTC	GTC	ATC	CGC	GGC	GGC	GAC	AAG	GTC	TCC	GCG	1459
Gly	Arg	Ile	Lys	Asp	Val	Val	Ile	Arg	Gly	Gly	Asp	Lys	Val	Ser	Ala	
	435				440					445					450	
ACC	GAG	GTC	GAG	GGC	CAC	CTG	GGC	GCC	CAC	CCC	GAC	GTC	CAG	CAG	GCC	1507
Thr	Glu	Val	Glu	Gly	His	Leu	Gly	Ala	His	Pro	Asp	Val	Gln	Gln	Ala	
				455				460						465		
GCC	GTC	GTC	GCC	ATG	CCC	GAC	CCG	GTG	TGG	GGC	GAG	AAG	GTC	TGC	GCC	1555
Ala	Val	Val	Ala	Met	Pro	Asp	Pro	Val	Trp	Gly	Glu	Lys	Val	Cys	Ala	
			470					475					480			
TAC	ATC	GTG	CCC	GCA	CCC	GGC	CGT	CCC	GCA	CCG	CCG	ATG	GCG	GCG	CTG	1603
Tyr	Ile	Val	Pro	Ala	Pro	Gly	Arg	Pro	Ala	Pro	Pro	Met	Ala	Ala	Leu	
		485					490					495				
CGC	CGG	CTG	CTG	CGC	GCG	CGG	GGA	CTG	GCC	GAC	TAC	AAG	CTT	CCC	GAC	1651
Arg	Arg	Leu	Leu	Arg	Ala	Arg	Gly	Leu	Ala	Asp	Tyr	Lys	Leu	Pro	Asp	
	500					505					510					
CGG	GTG	GAG	GTC	GTC	GAC	GCG	TTC	CCG	CTG	ACC	GGC	CTC	AAC	AAG	GTC	1699
Arg	Val	Glu	Val	Val	Asp	Ala	Phe	Pro	Leu	Thr	Gly	Leu	Asn	Lys	Val	
	515				520					525					530	
GAC	AAG	AAG	GCC	CTG	GCG	GCC	GAC	ATC	GCC	GCC	AAG	ACC	GCC	CCC	ACC	1747
Asp	Lys	Lys	Ala	Leu	Ala	Ala	Asp	Ile	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Thr	
				535				540						545		
CGC	CCC	ACC	ACC	GCC	GGC	CAC	GGC	CCG	ACC	ACG	GAC	GGC	GAT	ACG	GCC	1795
Arg	Pro	Thr	Thr	Ala	Gly	His	Gly	Pro	Thr	Thr	Asp	Gly	Asp	Thr	Ala	
			550					555					560			
GGT	GGG	GGT	GGG	TCC	GCG	GGC	GGG	GTG	ACG	GCC	GCC	GGT	GGC	GGG	CGG	1843
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Gly	Gly	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Arg	
		565					570					575				

GAG GAG GCG GCG TGAGCGGGCC CGGGCCCGAG GGCG
 Glu Glu Ala Ala
 580

1879

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 582 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Met	Leu	Asp	Gly	Cys	Val	Pro	Trp	Pro	Glu	Asp	Val	Ala	Ala	Lys	Tyr
1				5					10					15	
Arg	Ala	Ala	Gly	Tyr	Trp	Arg	Gly	Glu	Pro	Leu	Gly	Met	Leu	Leu	Gly
			20					25					30		
Arg	Trp	Ala	Glu	Gln	Tyr	Gly	Glu	Arg	Glu	Ala	Leu	Val	Gly	Ala	Asp
		35				40						45			
Gly	Cys	Ser	Arg	Val	Thr	Tyr	Arg	Ala	Leu	Asp	Arg	Trp	Cys	Asp	Arg
	50					55					60				
Leu	Ala	Ala	Gly	Phe	Ala	Ala	Arg	Gly	Ile	Gly	Ala	Gly	Glu	Arg	Val
65				70					75						80
Leu	Val	Gln	Leu	Pro	Asn	Thr	Pro	Glu	Phe	Val	Ala	Val	Cys	Phe	Ala
				85					90					95	
Leu	Phe	Arg	Leu	Gly	Ala	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Leu	Pro	Ala	His	Arg
			100					105					110		
Ala	Ala	Glu	Val	Gly	His	Leu	Leu	Glu	Leu	Ser	Gly	Ala	Val	Ala	His
		115				120						125			
Ile	Leu	Pro	Gly	Thr	Gly	Thr	Gly	Tyr	Asp	His	Val	Ala	Ala	Ala	Val
	130					135					140				
Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	Arg	Ala	Arg	Pro	Val	Gln	Val	Phe	Val	Ala	Gly
145				150						155					160
Glu	Ala	Pro	Ala	Val	Leu	Pro	Glu	Gly	Phe	Thr	Ala	Leu	Ala	Asp	Val
			165						170					175	
Asp	Gly	Asp	Pro	Val	Ala	Pro	Ala	Asp	Val	Asp	Ala	Phe	Arg	Arg	Gly
			180					185					190		
Val	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Gly	Thr	Thr	Ala	Leu	Pro	Lys	Leu	Ile	Pro
		195					200					205			
Arg	Thr	His	Asp	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Gln	Cys	Arg	Val	Thr	Ala	Gly	Ile
	210					215					220				
Cys	Gly	Leu	Asp	Ala	Asp	Ser	Val	Tyr	Leu	Ala	Val	Leu	Pro	Ala	Glu
225					230					235					240
Phe	Asn	Phe	Pro	Phe	Gly	Cys	Pro	Gly	Ile	Leu	Gly	Thr	Leu	His	Ala
				245					250					255	

Gly Gly Arg Val Val Phe Ala Leu Ser Pro Gln Pro Glu Glu Cys Phe
 260 265 270
 Ala Leu Ile Glu Arg Glu His Val Thr Phe Thr Ser Val Ile Pro Thr
 275 280 285
 Ile Val His Leu Trp Leu Ala Ala Ala Gln Gly His Gly Arg Asp
 290 295 300
 Leu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Gln Val Gly Ser Ala Lys Leu His Glu
 305 310 315 320
 Glu Leu Ala Ala Arg Ile Gly Pro Glu Leu Gly Val Arg Leu Gln Gln
 325 330 335
 Val Phe Gly Met Ala Glu Gly Leu Leu Thr Phe Thr Arg Asp Asp Asp
 340 345 350
 Pro Ala Asp Val Val Leu Arg Thr Gln Gly Arg Pro Val Ser Glu Ala
 355 360 365
 Asp Glu Ile Arg Val Ala Asp Pro Asp Gly Arg Pro Val Pro Arg Gly
 370 375 380
 Glu Thr Gly Glu Leu Leu Thr Arg Gly Pro Tyr Thr Leu Arg Gly Tyr
 385 390 395 400
 Tyr Arg Ala Pro Glu His Asn Ala Arg Ala Phe Thr Glu Asp Gly Phe
 405 410 415
 Tyr Arg Ser Gly Asp Leu Val Arg Leu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Val
 420 425 430
 Val Glu Gly Arg Ile Lys Asp Val Val Ile Arg Gly Gly Asp Lys Val
 435 440 445
 Ser Ala Thr Glu Val Glu Gly His Leu Gly Ala His Pro Asp Val Gln
 450 455 460
 Gln Ala Ala Val Val Ala Met Pro Asp Pro Val Trp Gly Glu Lys Val
 465 470 475 480
 Cys Ala Tyr Ile Val Pro Ala Pro Gly Arg Pro Ala Pro Pro Met Ala
 485 490 495
 Ala Leu Arg Arg Leu Leu Arg Ala Arg Gly Leu Ala Asp Tyr Lys Leu
 500 505 510
 Pro Asp Arg Val Glu Val Val Asp Ala Phe Pro Leu Thr Gly Leu Asn
 515 520 525
 Lys Val Asp Lys Lys Ala Leu Ala Ala Asp Ile Ala Ala Lys Thr Ala
 530 535 540
 Pro Thr Arg Pro Thr Thr Ala Gly His Gly Pro Thr Thr Asp Gly Asp
 545 550 555 560
 Thr Ala Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gly Gly Val Thr Ala Ala Gly Gly
 565 570 575
 Gly Arg Glu Glu Ala Ala
 580

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1833 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucl,ique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Streptomyces pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMENT: 103..1689

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

```

GGATCCCCCTC GCCCAGGGCC CTGGCGGGCC CGCCGGGGCCG TGGGGGAGGT GCGGGGGCCG      60
CGGGCCCCCGG CACCGCACGA ACAGAACAAC CGCTCCGGGC  CC ATG CGG ACT TCA      114
                                         Met Arg Thr Ser
                                         1

CGG TCC CAC GAC CAG CGG GCC CCT ACC CCC TGG AGA CAT CCC TTG CAC      162
Arg Ser His Asp Gln Arg Ala Pro Thr Pro Trp Arg His Pro Leu His
  5                      10                      15                      20

AGC ACC CGG CCC GCG CCC GCG GCC GAC CGT GAC CCC AGG CGC TGG GTC      210
Ser Thr Arg Pro Ala Pro Ala Ala Asp Arg Asp Pro Arg Arg Trp Val
                      25                      30                      35

ATC CTC GGC GTG ATC TGC CTG GCC CAA CTC GTC GTC CTG CTC GAC AAC      258
Ile Leu Gly Val Ile Cys Leu Ala Gln Leu Val Val Leu Leu Asp Asn
                      40                      45                      50

ACC GTC CTC AAC GTC GCC ATC CCG GTG CTC ACC ACC GAC CTG GGC GCC      306
Thr Val Leu Asn Val Ala Ile Pro Val Leu Thr Thr Asp Leu Gly Ala
                      55                      60                      65

AGC ACC GCC GAC ATC CAG TGG ATG ATC AAC GCC TAC GCG CTC GTG CAG      354
Ser Thr Ala Asp Ile Gln Trp Met Ile Asn Ala Tyr Ala Leu Val Gln
                      70                      75                      80

TCC GGG CTG CTG CTC ACC GCG GGC AGC CTC GCG GAC CGC TAC GGC CGC      402
Ser Gly Leu Leu Leu Thr Ala Gly Ser Leu Ala Asp Arg Tyr Gly Arg
                      85                      90                      95                      100

AAA CGG CTG CTG ATG CTC GGA CTG GTG CTC TTC GGC GCC GGG TCC GCC      450
Lys Arg Leu Leu Met Leu Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ala
                      105                      110                      115

TGG GCG GCC TTC GCC CAG GAC TCC GCC CAA CTC ATC GCC GCC CGG GCC      498
Trp Ala Ala Phe Ala Gln Asp Ser Ala Gln Leu Ile Ala Ala Arg Ala
                      120                      125                      130

```

GGC	ATG	GGC	GTG	GGC	GGG	GCG	CTG	CTG	GCG	ACC	ACC	ACC	CTC	GCC	GTC	546
Gly	Met	Gly	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Thr	Thr	Leu	Ala	Val	
		135					140					145				
ATC	ATG	CAG	GTC	TTC	GAC	GAC	GAC	GAA	CGC	CCC	CGG	GCG	ATC	GGC	CTG	594
Ile	Met	Gln	Val	Phe	Asp	Asp	Asp	Glu	Arg	Pro	Arg	Ala	Ile	Gly	Leu	
	150					155					160					
TGG	GGA	GCG	GCC	AGC	TCA	CTG	GGC	TTC	GCG	GCC	GGC	CCG	CTG	CTC	GGC	642
Trp	Gly	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Phe	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Gly	
	165				170					175					180	
GGC	GCC	CTC	CTC	GAC	CAC	TTC	TGG	TGG	GCG	TCC	ATC	TTC	CTG	ATC	AAC	690
Gly	Ala	Leu	Leu	Asp	His	Phe	Trp	Trp	Gly	Ser	Ile	Phe	Leu	Ile	Asn	
				185					190					195		
CTG	CCC	GTC	GCG	CTG	CTG	GGC	CTG	CTG	GCC	GTC	GCC	CGC	CTG	GTG	CCC	738
Leu	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Val	Pro	
			200				205						210			
GAG	ACG	AAG	AAC	CCC	GAA	GGC	CGG	CGC	CCC	GAC	CTG	CTC	GGC	GCC	GTG	786
Glu	Thr	Lys	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg	Arg	Pro	Asp	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	
		215				220					225					
CTC	TCC	ACC	CTC	GGC	ATG	GTC	GGC	GTC	GTC	TAC	GCC	ATC	ATC	TCC	GGC	834
Leu	Ser	Thr	Leu	Gly	Met	Val	Gly	Val	Val	Tyr	Ala	Ile	Ile	Ser	Gly	
		230			235					240						
CCC	GAA	CAC	GGC	TGG	ACG	GCC	CCG	CAG	GTC	CTC	CTG	CCG	GCC	GCC	GTC	882
Pro	Glu	His	Gly	Trp	Thr	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Val	
	245				250				255						260	
GCG	GCC	GCC	GCG	CTC	ACC	GCG	TTC	GTC	CGC	TGG	GAA	CTG	CAC	ACC	CCC	930
Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Arg	Trp	Glu	Leu	His	Thr	Pro	
			265					270					275			
CAC	CCC	ATG	CTC	GAC	ATG	GGC	TTC	TTC	ACC	GAC	CGG	CGC	TTC	AAC	GGG	978
His	Pro	Met	Leu	Asp	Met	Gly	Phe	Phe	Thr	Asp	Arg	Arg	Phe	Asn	Gly	
			280				285						290			
CCG	TCG	CCG	GCG	GAG	TGC	TCG	TCG	TTC	GGC	ATG	GCC	GGC	TCG	CTC	TTC	1026
Pro	Ser	Pro	Ala	Glu	Cys	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	Ala	Gly	Ser	Leu	Phe	
		295				300						305				
CTG	CTC	ACC	CAG	CAC	CTC	CAA	CTC	GTC	CTC	GGC	TAC	GAC	GCC	CTG	CAG	1074
Leu	Leu	Thr	Gln	His	Leu	Gln	Leu	Val	Leu	Gly	Tyr	Asp	Ala	Leu	Gln	
		310				315					320					
GCC	GGC	CTG	CGC	ACC	GCG	CCA	CTG	GCT	TTG	ACG	ATC	GTC	GCC	CTC	AAC	1122
Ala	Gly	Leu	Arg	Thr	Ala	Pro	Leu	Ala	Leu	Thr	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	
	325				330				335						340	
CTG	GCC	GGC	CTC	GGC	GCG	AAA	CTC	CTC	GCC	GCG	CTC	GGC	ACC	GCC	CGC	1170
Leu	Ala	Gly	Leu	Gly	Ala	Lys	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Thr	Ala	Arg	
				345				350						355		
AGC	ATC	GCC	CTG	GGC	ATG	ACA	CTG	CTG	GCC	GCC	GGC	CTC	AGC	GCG	GTG	1218
Ser	Ile	Ala	Leu	Gly	Met	Thr	Leu	Leu	Ala	Ala	Gly	Leu	Ser	Ala	Val	
			360				365					370				
GCC	GTC	GGC	GGA	TCG	GGC	CCC	GAC	GCC	GCG	TAC	GGC	GGC	ATG	CTC	GCC	1266
Ala	Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Pro	Asp	Ala	Gly	Tyr	Gly	Gly	Met	Leu	Ala	

375					380					385						
GGC	CTG	CTC	CTC	ATG	GGC	GCG	GGC	ATC	GCA	CTG	GCC	ATG	CCC	GCC	ATG	1314
Gly	Leu	Leu	Leu	Met	Gly	Ala	Gly	Ile	Ala	Leu	Ala	Met	Pro	Ala	Met	
	390					395					400					
GCC	ACC	GCC	GTG	ATG	TCC	TCC	ATC	CCG	CCC	GCC	AAG	GCC	GGG	GCC	GGA	1362
Ala	Thr	Ala	Val	Met	Ser	Ser	Ile	Pro	Pro	Ala	Lys	Ala	Gly	Ala	Gly	
	405					410					415				420	
GCG	GGC	GTG	CAG	GGC	ACC	CTG	ACC	GAG	TTC	GGC	GGC	GGA	CTG	GGA	GTG	1410
Ala	Gly	Val	Gln	Gly	Thr	Leu	Thr	Glu	Phe	Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Val	
				425					430					435		
GCG	ATC	CTC	GGC	GCC	GTC	CTC	GGC	TCC	CGC	TTC	GCC	TCC	CAA	CTG	CCC	1458
Ala	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Arg	Phe	Ala	Ser	Gln	Leu	Pro	
			440					445					450			
GCC	GCC	ATC	ACC	GGC	ACC	GGC	TCC	CTC	GAC	GAG	GCA	CTG	CGC	GAC	GCC	1506
Ala	Ala	Ile	Thr	Gly	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Glu	Ala	Leu	Arg	Asp	Ala	
			455				460					465				
ACA	CCC	CAA	CAG	GCC	GGG	CAG	GTC	CAC	GAC	GCG	TTC	GCC	GAC	GCG	GTG	1554
Thr	Pro	Gln	Gln	Ala	Gly	Gln	Val	His	Asp	Ala	Phe	Ala	Asp	Ala	Val	
	470					475					480					
AAC	ACC	AGC	CAA	CTC	ATC	GGC	GCC	GCC	GCC	GTG	TTC	ACC	GGC	GGC	CTG	1602
Asn	Thr	Ser	Gln	Leu	Ile	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Phe	Thr	Gly	Gly	Leu	
	485					490					495				500	
CTC	GCC	GCG	CTG	CTG	CTG	CAC	CGC	GCC	GAC	CGC	AAG	GCC	GCC	CCC	CAG	1650
Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	His	Arg	Ala	Asp	Arg	Lys	Ala	Ala	Pro	Gln		
			505					510					515			
CCC	ACC	GCC	CCC	ACC	CCC	GAA	CCC	ACC	ACC	ACC	GCC	TGACCCCCGG				1696
Pro	Thr	Ala	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	Thr	Thr	Thr	Ala					
			520					525								
CCCCCGGGC	ACCACACAAC	CCACGGCCCC	ACCCCTGCGG	CTCCCCACCG	GGACCCACAG											1756
GGGCGGGGCC	GTGCCGCTGC	CCTGCCACAC	CACACAGCCC	CCACACACAC	AGCCCCCGCA											1816
CGGCCGACAG	CGCCGGG															1833

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 528 acides amin,s

(B) TYPE: acide amin,

(D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

Met	Arg	Thr	Ser	Arg	Ser	His	Asp	Gln	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro	Trp	Arg
1				5					10					15	
His	Pro	Leu	His	Ser	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Asp	Arg	Asp	Pro
			20					25				30			
Arg	Arg	Trp	Val	Ile	Leu	Gly	Val	Ile	Cys	Leu	Ala	Gln	Leu	Val	Val

35					40					45					
Leu	Leu	Asp	Asn	Thr	Val	Leu	Asn	Val	Ala	Ile	Pro	Val	Leu	Thr	Thr
50						55					60				
Asp	Leu	Gly	Ala	Ser	Thr	Ala	Asp	Ile	Gln	Trp	Met	Ile	Asn	Ala	Tyr
65					70					75					80
Ala	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Ser	Leu	Ala	Asp
				85					90					95	
Arg	Tyr	Gly	Arg	Lys	Arg	Leu	Leu	Met	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Phe	Gly
			100					105					110		
Ala	Gly	Ser	Ala	Trp	Ala	Ala	Phe	Ala	Gln	Asp	Ser	Ala	Gln	Leu	Ile
		115					120					125			
Ala	Ala	Arg	Ala	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Thr
		130				135					140				
Thr	Leu	Ala	Val	Ile	Met	Gln	Val	Phe	Asp	Asp	Asp	Glu	Arg	Pro	Arg
145					150					155					160
Ala	Ile	Gly	Leu	Trp	Gly	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Phe	Ala	Ala	Gly
				165					170					175	
Pro	Leu	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu	Asp	His	Phe	Trp	Trp	Gly	Ser	Ile
			180					185					190		
Phe	Leu	Ile	Asn	Leu	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Val	Ala
		195					200					205			
Arg	Leu	Val	Pro	Glu	Thr	Lys	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg	Arg	Pro	Asp	Leu
		210				215					220				
Leu	Gly	Ala	Val	Leu	Ser	Thr	Leu	Gly	Met	Val	Gly	Val	Val	Tyr	Ala
225					230					235					240
Ile	Ile	Ser	Gly	Pro	Glu	His	Gly	Trp	Thr	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Leu
				245					250					255	
Pro	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Arg	Trp	Glu
			260					265					270		
Leu	His	Thr	Pro	His	Pro	Met	Leu	Asp	Met	Gly	Phe	Phe	Thr	Asp	Arg
		275					280					285			
Arg	Phe	Asn	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Glu	Cys	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	Ala
		290				295					300				
Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Leu	Thr	Gln	His	Leu	Gln	Leu	Val	Leu	Gly	Tyr
305					310					315					320
Asp	Ala	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Arg	Thr	Ala	Pro	Leu	Ala	Leu	Thr	Ile
				325					330					335	
Val	Ala	Leu	Asn	Leu	Ala	Gly	Leu	Gly	Ala	Lys	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu
			340					345					350		
Gly	Thr	Ala	Arg	Ser	Ile	Ala	Leu	Gly	Met	Thr	Leu	Leu	Ala	Ala	Gly
		355					360					365			
Leu	Ser	Ala	Val	Ala	Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Pro	Asp	Ala	Gly	Tyr	Gly

370				375				380							
Gly 385	Met	Leu	Ala	Gly 390	Leu	Leu	Leu	Met	Gly 395	Ala	Gly	Ile	Ala	Leu	Ala 400
Met	Pro	Ala	Met	Ala 405	Thr	Ala	Val	Met	Ser 410	Ser	Ile	Pro	Pro	Ala	Lys 415
Ala	Gly	Ala	Gly 420	Ala	Gly	Val	Gln	Gly 425	Thr	Leu	Thr	Glu	Phe 430	Gly	Gly
Gly	Leu	Gly 435	Val	Ala	Ile	Leu	Gly 440	Ala	Val	Leu	Gly	Ser 445	Arg	Phe	Ala
Ser	Gln 450	Leu	Pro	Ala	Ala	Ile 455	Thr	Gly	Thr	Gly	Ser 460	Leu	Asp	Glu	Ala
Leu 465	Arg	Asp	Ala	Thr 470	Pro	Gln	Gln	Ala	Gly	Gln 475	Val	His	Asp	Ala	Phe 480
Ala	Asp	Ala	Val	Asn 485	Thr	Ser	Gln	Leu	Ile 490	Gly	Ala	Ala	Ala	Val 495	Phe
Thr	Gly	Gly	Leu 500	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu 505	His	Arg	Ala	Asp 510	Arg	Lys
Ala	Ala	Pro 515	Gln	Pro	Thr	Ala	Pro 520	Thr	Pro	Glu	Pro	Thr 525	Thr	Thr	Ala

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines.

2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :

(a) tout ou partie des gènes snaA (SEQ ID n° 2), snaB (SEQ ID n° 4), snaC (SEQ ID n° 6), snbA (SEQ ID n° 8) et snbR (SEQ ID n° 10),

(b) les séquences adjacentes aux gènes (a) constituant les clusters de biosynthèse et codant pour les polypeptides impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines,

(c) les séquences hybridant avec tout ou partie des gènes (a) ou (b) et codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, et,

(d) les séquences dérivées des séquences (a), (b) et (c) en raison de la dégénérescence du code génétique.

3. Séquence nucléotidique selon la revendication 2 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les gènes snaA, snaB, snaC, snbA et snbR.

4. ADN recombinant comprenant un gène de biosynthèse des Streptogramines.

5. ADN recombinant selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie des cosmides pIBV1 ou pIBV2 tels que représentés sur les figures 4 et 5 ou tout ou partie de séquences hybridant avec les cosmides pIBV1 ou pIBV2 ou avec des fragments de ceux-ci.

6. Vecteur d'expression à répllication autonome et/ou intégratif caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 3 ou un ADN recombinant selon l'une des revendications 4 et 5.

7. Vecteur selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le cosmide pIBV1 (figure 4), le cosmide pIBV2 (figure 5), le plasmide pVRC402 (figure 8(A)), le plasmide pVRC501 (figure 8(B)), le plasmide pXL2045 (figure 9), le plasmide pVRC505 (figure 10) et le plasmide pVRC507 (figure 11).

8. Cellule recombinante contenant une séquence nucléotidique et/ou un ADN recombinant et/ou un vecteur d'expression selon l'une des revendications 1 à 7.

9. Procédé de production d'un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinante selon la revendication 8 et on récupère le polypeptide produit.

10. Utilisation d'une cellule recombinante selon la revendication 8 exprimant un polypeptide au moins impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, dans une réaction de bioconversion.

11. Utilisation d'une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5 pour amplifier la production de Streptogramines.

12. Procédé de production de Streptogramines caractérisé en ce que :

- on introduit et/ou on amplifie dans une cellule productrice de Streptogramines ou potentiellement productrice de Streptogramines une ou plusieurs séquences et/ou vecteurs selon l'une des revendications 1 à 7,
- on cultive ladite cellule dans des conditions de production des Streptogramines, et,
- on récupère les Streptogramines produites.

13. Procédé selon la revendication 12 pour la production de Pristinamycines, Mikamycines ou Virginiamycines.

14. Procédé de préparation de cellules bloquées dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines caractérisé en ce que l'on effectue, sur une cellule productrice de Streptogramine, une mutagénèse sur au moins un gène de la voie de biosynthèse.

15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que la mutagénèse est effectuée in vitro ou in situ, par suppression, substitution, délétion et/ou addition d'une ou plusieurs bases dans le gène considéré, ou par disruption génique.

16. Mutant d'un microorganisme producteur de Streptogramines caractérisé en ce qu'il possède une modification génétique au moins dans un gène impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines.

17. Procédé de préparation d'un intermédiaire de biosynthèse des Streptogramines caractérisé en ce que :

- on prépare une cellule bloquée dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines selon la revendication 14,
- on cultive ladite cellule, et
- on récupère l'intermédiaire accumulé.

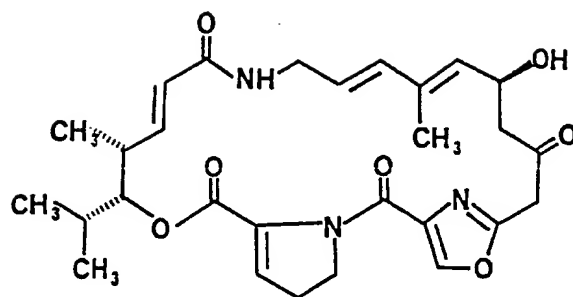
18. Procédé de préparation d'une molécule dérivée des Streptogramines caractérisé en ce que :

- on prépare une cellule bloquée dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines selon la revendication 14,
- on cultive ladite cellule, et
- on modifie l'intermédiaire accumulé par cette cellule, éventuellement après séparation du milieu de culture.

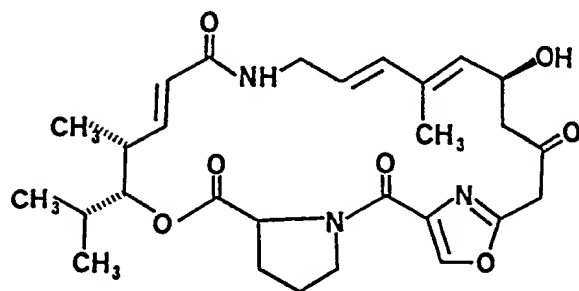
19. Utilisation d'une séquence et/ou d'un vecteur selon l'une des revendications 1 à 7 pour la préparation d'antibiotiques hybrides.

20. Polypeptide résultant de l'expression d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 5.

21. Polypeptide comprenant tout ou partie des polypeptides SnaA (SEQ ID n° 3), SnaB (SEQ ID n° 5), SnaC (SEQ ID n° 7), SnbA (SEQ ID n° 9) et SnbR (SEQ ID n° 11) ou de dérivés de ceux-ci.



Formule 1

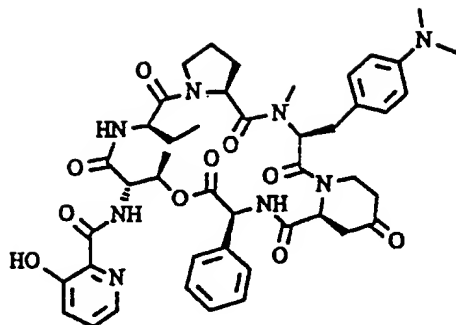


Formule 2

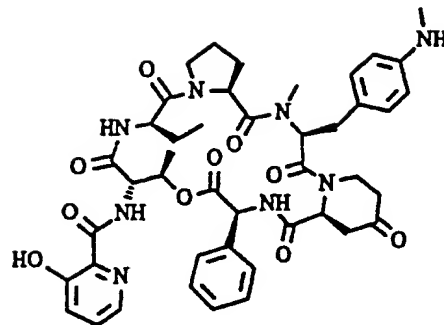
Formule 1	Formule 2
Pristinamycine IIA	Pristinamycine IIB
Mikamycine A	
Ostréogrycine A	Ostréogrycine G
Streptogramine A	
Synergistine A-I	
Vernamycine A	
Virginiamycine M ₁	Virginiamycine M ₂

FIGURE 1

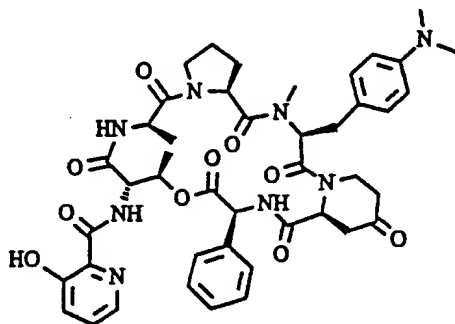
2/11



Formule 1



Formule 2

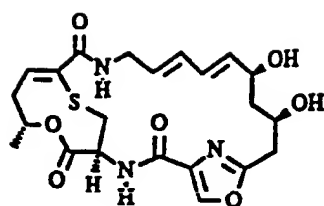


Formule 3

Formule 1	Formule 2	Formule 3
Pristinamycine IA Streptogramine B PA114B1	Pristinamycine IB	Pristinamycine IC
Vernamycine B α	Vernamycine B β	Vernamycine B γ
Ostréogrycine B	Ostréogrycine B2	Ostréogrycine B1
Mikamycine IA		

FIGURE 2

A

CC(C)C[C@@H](C)[C@H](C(=O)N[C@@H]1C=CC=C[C@H](C)[C@H](O)CC(=O)N[C@@H]2C=CC=C[C@H](C)[C@H](C)C2=O)C(=O)N[C@@H]3C=CC=C[C@H](C)[C@H](C)C3=O

MADUMYCIN I

B

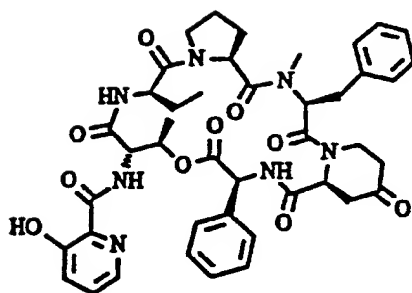
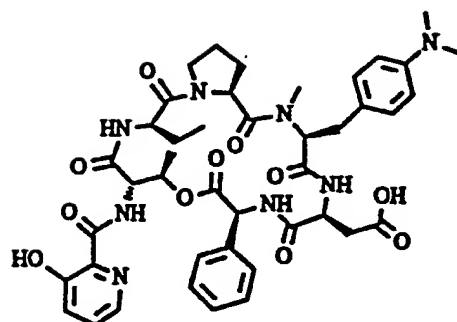
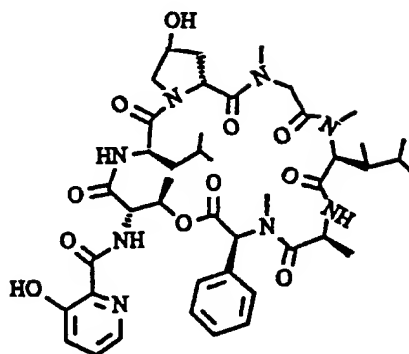
**VIRGINIAMYCIN S₁****VERNAMYCIN C****ETAMYCIN**

FIGURE 3

4/11

pIBV1

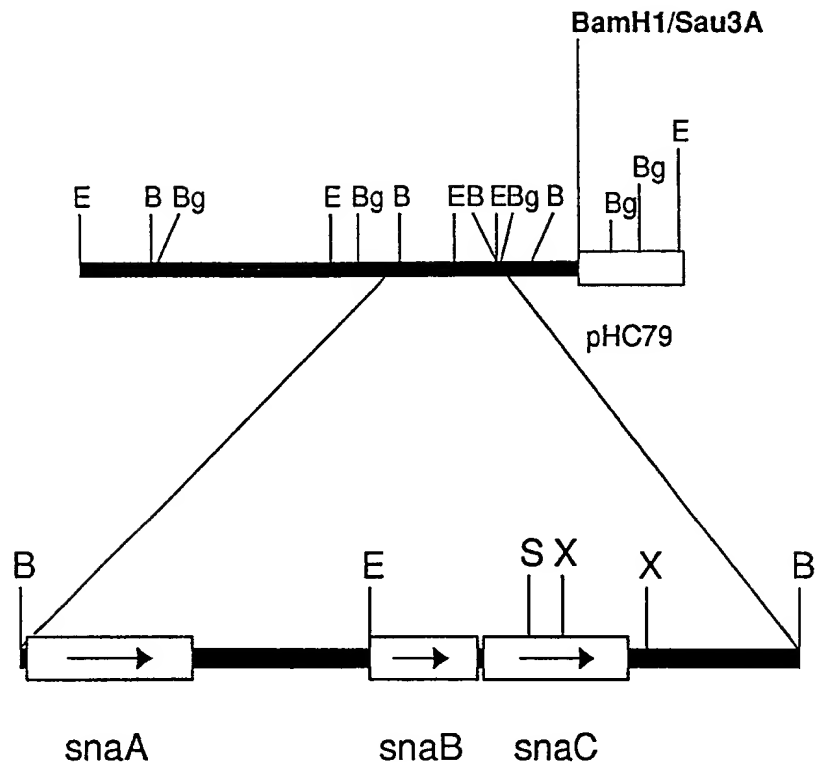


FIGURE 4

5/11

pIBV2

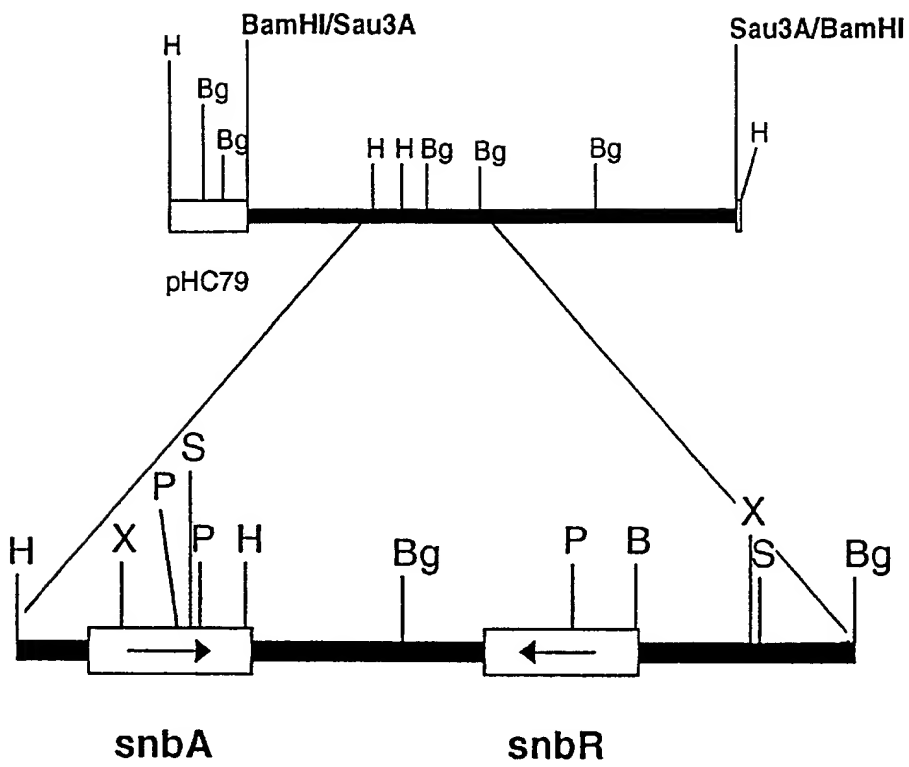


FIGURE 5

6/11

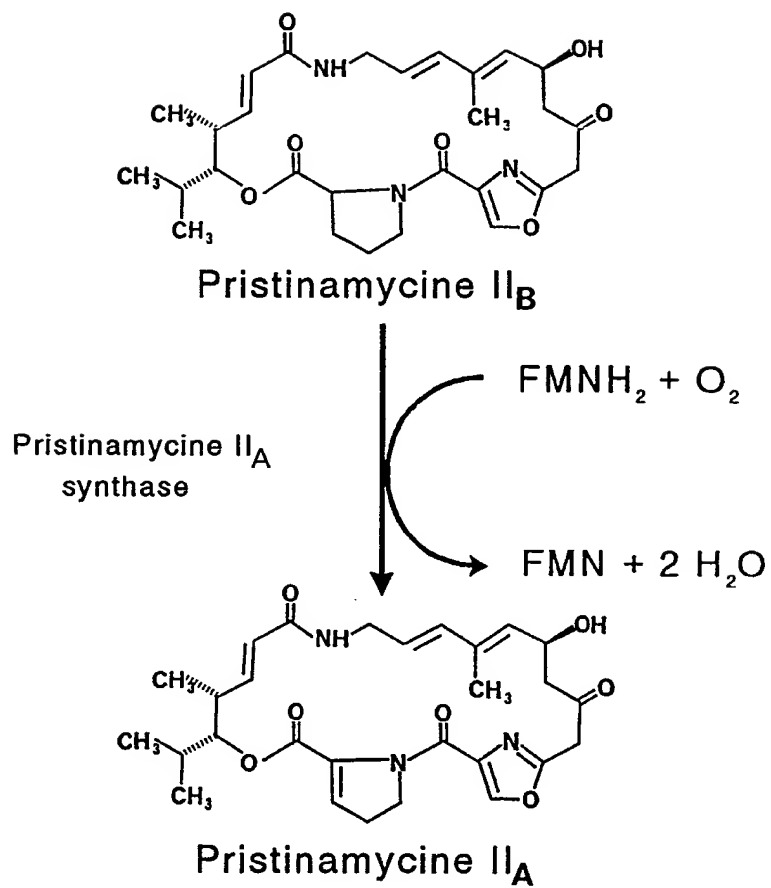


FIGURE 6

7/11

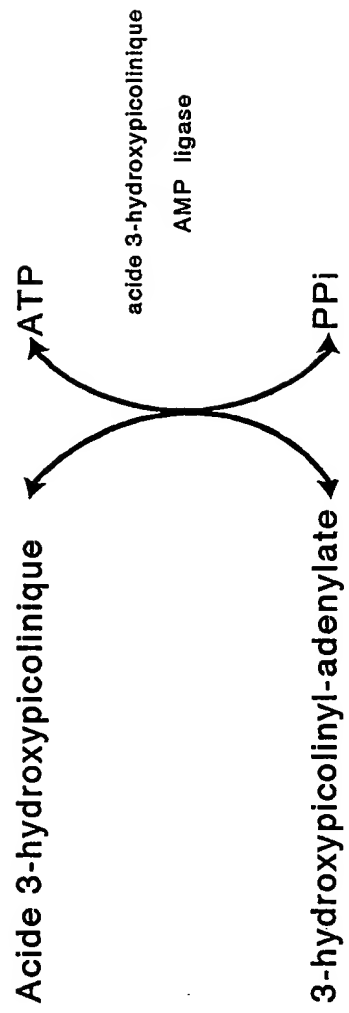


FIGURE 7

8/11

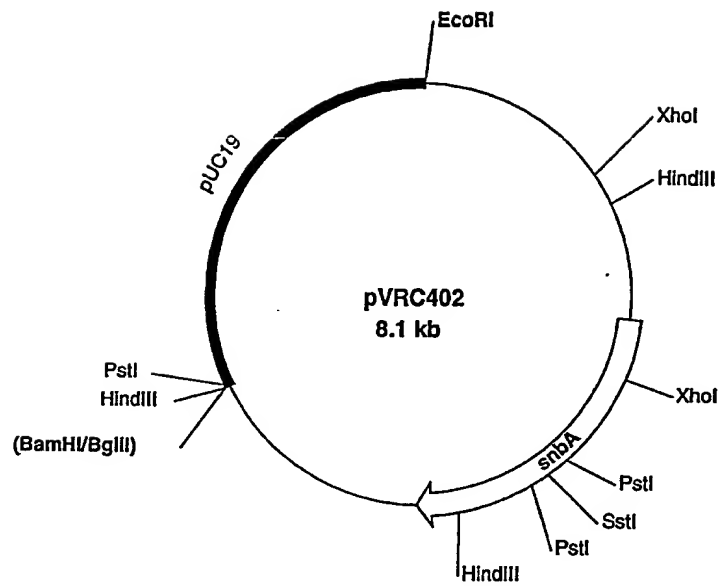


FIGURE 8 (A)

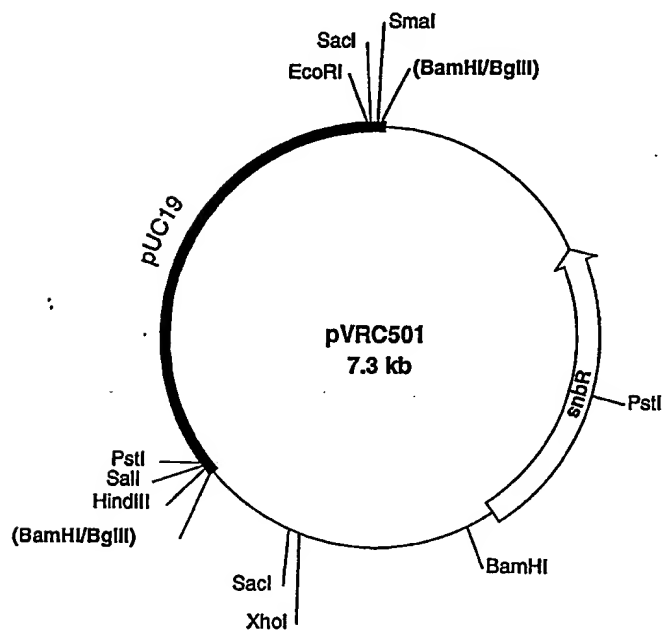


FIGURE 8 (B)

9/11

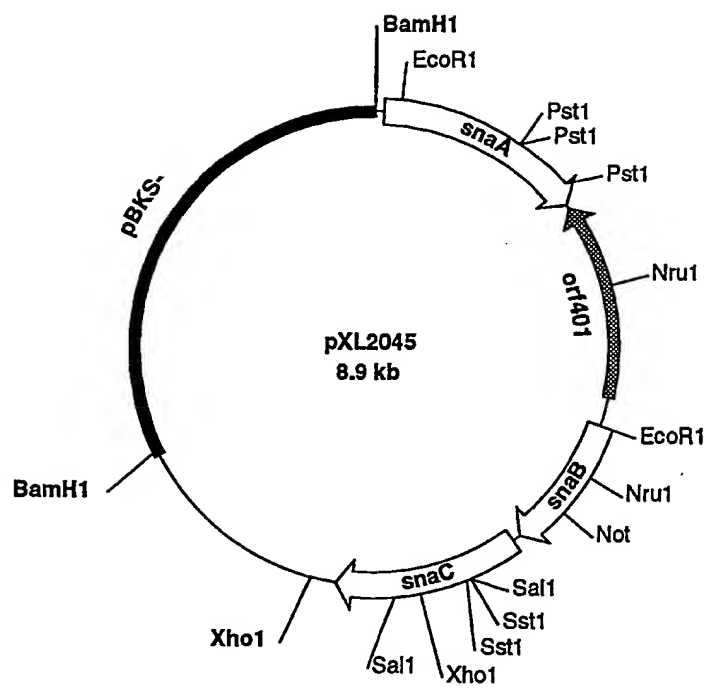


FIGURE 9

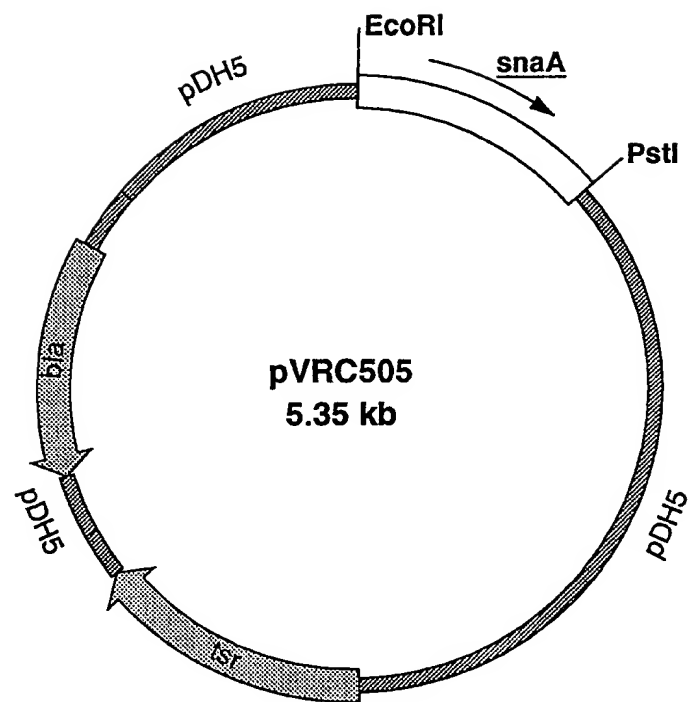


Figure 10

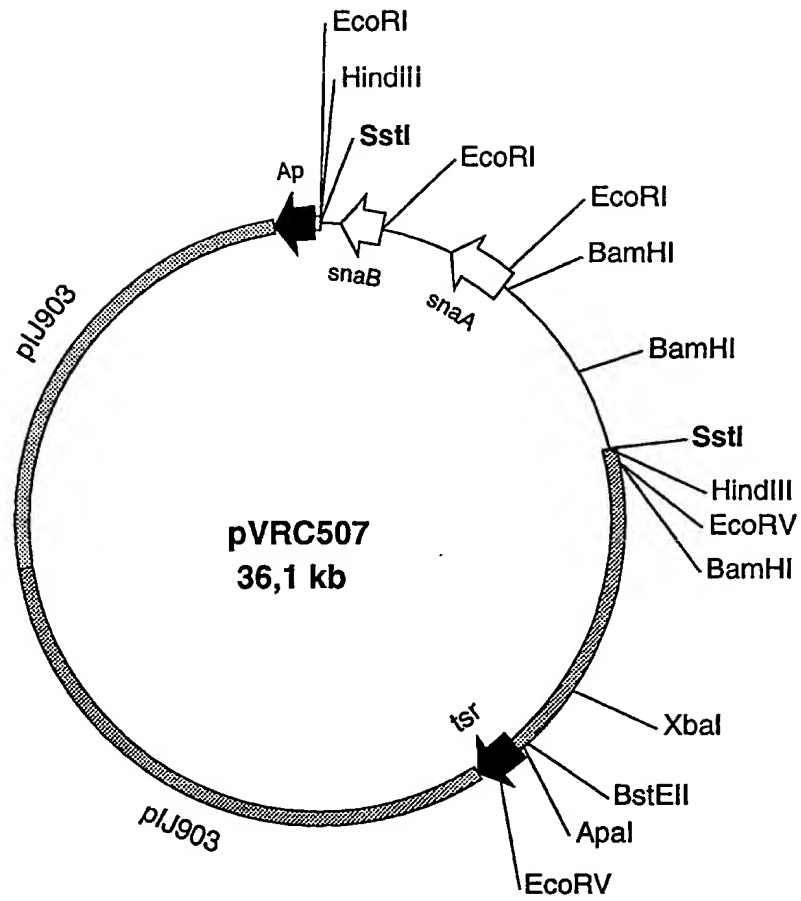


Figure 11

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FR 9211441
FA 477042
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	BIOTECHNOLOGY vol. 8, Février 1990, NEW YORK US pages 115 - 121 KEITH F. CHATER ET AL 'The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing Streptomyces' * le document en entier * ---	1-21
D,A	GENE. vol. 74, 1988, AMSTERDAM NL pages 305 - 320 S. E. HALLAM ET AL 'Nucleotide sequence , transcription and deduced function of a gene involved in polyketide antibiotic synthesis in Streptomyces coelicolor' ---	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 23, 9 Décembre 1991, Columbus, Ohio, US; abstract no. 251978n, FUNANE, KAZUMI ET AL 'Isolation and properties of IMfactor (an inducer of secondary metabolite production)deficient mutants of Streptomyces virgineae MAFF 10-06014' page 453 ;colonne R ; * abrégé * & SHOKUHIN SOGO KENKYU HOKOKU vol. 55, 1991, pages 37 - 44 ---	14-16
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C12N C07K
X	DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES vol. 22, 1984, pages 695 - 720 A. M. BIOT 'Virginiamycin : properties , biosynthesis and fermentation' * page 703 * ---	16
	--- -/--	
Date d'achèvement de la recherche 02 JUILLET 1993		Examinateur LE CORNEC N.D.R.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document Intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
P,X	BIOTECHNOLOGY LETTERS vol. 14, no. 11, Novembre 1992, pages 1065 - 1070 V. PAQUET ET AL 'Induction of pristinamycins production in Streptomyces pristinaespiralis' * abrégé * -----	14-16
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche 02 JUILLET 1993		Examinateur LE CORNEC N.D.R.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		